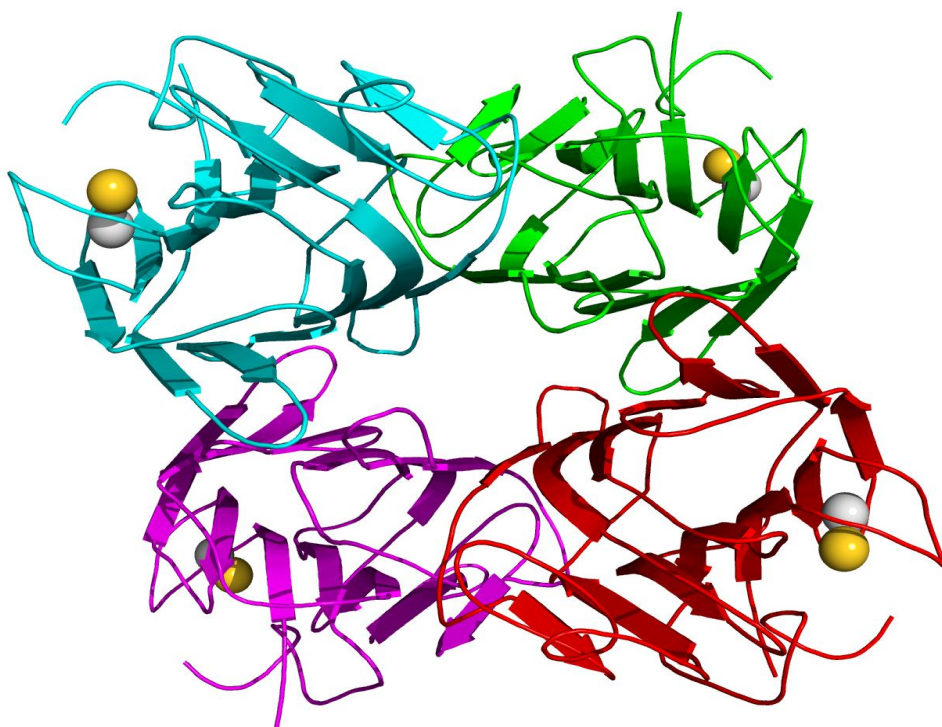


Diseños supramoleculares para reconocimiento y transporte de proteínas

Trabajo de fin de grado

Curso 2015-2016



Santiago de Compostela, Julio 2016

Departamento de Química Orgánica y Centro Singular de Investigación en Química
Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS)

D. Juan R. Granja Guillán, catedrático del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela y **D. Javier Montenegro García**, Investigador Ramón y Cajal en el departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela.

Certifican:

Que el trabajo titulado *“Diseños supramoleculares para reconocimiento y transporte de proteínas”* fue realizado por **Iván Gallego Gómez** bajo su dirección en los laboratorios del Centro de Investigación en Química Biológica y Materiales moleculares (CIQUS). Considerando que constituye una memoria para superar la asignatura Trabajo de Fin de Grado perteneciente al Grado en Química y autorizan su presentación en la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide la presente autorización en Santiago de Compostela a 13 de Julio 2016

Fdo. Juan R. Granja Guillán

Fdo. Javier Montenegro

Índice

<i>Abreviaturas</i>	5
1. Resumen	6
1. Resumo.....	6
1. Abstract	6
2. Introducción	7
2.1 Antecedentes y mecanismos de captación de los péptidos penetrantes de membrana (CPPs).....	7
2.1.1 Penetración directa	9
2.1.2 Translocación mediada por endocitosis	9
2.1.3 Translocación mediante la formación de estructuras transitorias	10
2.2 Aplicaciones de los péptidos penetrantes de membrana (CPPs)	11
2.3 Conceptos previos	12
2.3.1 El enlace peptídico	12
2.3.2 Estructura de las proteínas	14
2.3.3 Reconocimiento de azúcares	16
2.3.4 Estudios de dicroísmo circular	17
2.3.5 Síntesis peptídica en fase sólida	18
2.3.6 Síntesis peptídica en fase sólida mediante el método Fmoc	19
3. Objetivos	22
4. Discusión de resultados	23
4.1 Diseño general de la estructura del péptido.....	23
4.2 Acoplamiento y reactividad de los diferentes sacáridos	24
4.3 Acoplamiento del fluoróforo.....	27
4.4 Determinación estructural mediante dicroísmo circular.....	28
4.5 Estudios de internalización en células	29
5. Procedimiento experimental	31
5.1 Descripción general de reactivos e instrumentos	31
5.2 Síntesis	32
5.2.1 Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)	32
5.2.2 Acoplamiento de diferentes sacáridos al péptido	33
5.3 Caracterización de los compuestos	34
5.4 Protocolo de internalización celular	44
5.4.1 Internalización del péptido	44
5.4.2 Internalización del péptido con la proteína	44
6. Conclusiones	45
6. Conclusións	45
6. Conclusions	45

<i>Anexo I. L-Aminoácidos</i>	<i>47</i>
<i>Anexo II. Grupos protectores de aminoácidos</i>	<i>48</i>

Abreviaturas

δ : *desplazamiento químico (ppm)*

Aa: *aminoácido*

Boc: *tert – butoxicarbonilo*

CPP: *Péptidos penetrantes de células*

CF: *5(6) – carboxifluoresceína*

DCM: *diclorometano*

Derivado D-manosa: *α – formilmetil – manopiranosido*

DIEA: *n, n' – Etildiisopropilamina*

DMF: *n, n' – dimetilformaamida*

Eq: *equivalente*

Fmoc: *9 – Fluorenilmetoxicarbonil*

N-HATU: *1 – [Bis(dimetilamino)metilen] – 1H – 1,2,3 – triazolo[4,5 – b] – piridin 3 – óxido hexafluorofosfato*

N-HBTU: *Hexafluorofosfato de n – óxido de n – [(1H – benzotriazol – 1 – il)dimetilamino metilen] – n – metilmetanaminio*

HEPES: *Ácido 2 – [4 – (2 – hidroxietil)piperazin – 1 – il]etanosulfónico*

HFIP: *1,1,1,3,3,3 – Hexafluoro – 2 – propanol*

Hidroxilaminas: *Ácido (Boc – aminooxi) acético*

HPLC: *Cromatografía líquida de alta resolución*

J: *Constante de acoplamiento*

MS: *espectrometría de masas*

Mtt: *4 – Metiltritol*

Pbf: *2,2,4,6,7 – pentametildihidrobenzofurano – 5 – sulfonilo*

Rink Amida: *Resina 4 – (2',4' – dimetoxifenil – Fmoc – aminometil) – fenoxi*

RMN: *Resonancia magnética nuclear*

SPPS: *Síntesis en fase sólida*

TFA: *Ácido trifluoroacético*

TFE: *2,2,2 – trifluoroetanol*

TIS: *Triisopropilsilano*

TNBS: *Ácido 2,4,6 – Trinitrobenceno sulfónico*

1. Resumen

La sobreexpresión de proteínas de forma aberrante es un fenotipo común de enfermedades y tumores malignos. La membrana celular resulta esencial para la regulación de funciones y el intercambio de información, sin embargo, en muchas ocasiones, supone una barrera para la internalización de moléculas bioactivas y el tratamiento de enfermedades. La posibilidad de controlar el tráfico de proteínas a través de la membrana representa una oportunidad única para la comprensión y el desarrollo de nuevas terapias y métodos de diagnóstico. Es decir, poder transportar e internalizar macromoléculas hacia el interior de las células permitiría modular externamente la regulación y la comunicación celular.

1. Resumo

A sobreexpresión de proteínas é un fenotipo común de enfermidades e tumores malignos. A membrana celular resulta esencial para a regulación de funcións e o intercambio de información, sen embargo, en moitas ocasións, supón unha barreira para a internalización de moléculas bioactivas e o tratamento de enfermidades. A posibilidade de controlar o tráfico de proteínas a través da membrana representa unha oportunidade única para a comprensión e o desenvolvemento de novas terapias e métodos de diagnose. É dicir, poder transportar e internalizar macromoléculas cara o interior das células permitiría modular externamente a regulación e a comunicación celular.

1. Abstract

The continuous overexpression of proteins is a common phenotype of disease and malignant tumours. The cell membrane is essential to the regulation of functions and the exchange of information, however in many occasions; is a barrier to the internalization of bioactive molecules and treatment of diseases. The possibility of controlling the traffic of proteins trough the cell membrane is an unique opportunity of understanding and developing new therapies and diagnose methods. Which is the same, the transport of macromolecules inside the cell allows to the modulation of the cell communication and regulation from outside.

2. Introducción

La membrana plasmática de las células eucariotas es una gran barrera de control diseñada para proteger a la célula de la entrada de moléculas bioactivas. Pequeñas moléculas y fármacos proteicos pueden atravesar la membrana a través de un proceso de secuestro natural o mediante una difusión directa a través de la membrana lipídica; sin embargo en muchos otros casos, estos dos mecanismos de entrada resultan inefficientes para moléculas exógenas. Por este motivo, se han buscado transportadores moleculares que faciliten la entrada de agentes farmacéuticos activos al interior de las células¹.

En los últimos años se ha descubierto que ciertos dominios de péptidos ricos en aminoácidos catiónicos son responsables del paso de proteínas a través de la membrana (CPPs, péptidos penetrantes de células). Se han encontrado numerosas aplicaciones para estos péptidos penetrantes de membrana, de tal forma que esta química peptídica ha sido explotada como un medio para proporcionar nuevas herramientas a la biología y a la medicina. Numerosos tipos de fármacos han sido transportados al interior celular utilizando CPPs, de tal forma que esta bioconjugación ha permitido la captación celular y en algunos casos la especificidad del tipo celular.

2.1 Antecedentes y mecanismo de captación de los péptidos penetrantes de membrana (CPPs)

Un gran avance en la identificación de estos transportadores se realizó a principios de 1990 cuando una serie de secuencias de péptidos cortos fueron capaces de atravesar la membrana plasmática de manera eficiente. Uno de estos péptidos que recibió gran atención fue el péptido *Tat* (Transactivador de la transcripción génica) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Este descubrimiento, junto con el de otros péptidos con actividad para atravesar la membrana y con la capacidad para transportar diversos tipos de cargas moleculares, sirvió como inicio para el estudio de un nuevo campo centrado en CPPs como transportadores moleculares, un gran avance para la entrada no invasiva de biomoléculas no permeables en membranas biológicas. En la **Tabla 1** aparecen algunos ejemplos de los CPPs utilizados comunmente; algunos de ellos, como el *Tat* y Penetratina, derivan de secuencias naturales, mientras que otros son estructuras diseñadas artificialmente con las características más importantes de los sistemas naturales¹.

Tabla 1. Péptidos de membrana comúnmente utilizados para diferentes aplicaciones de internalización.

Cell-penetrating peptide	Amino acid sequence
Polyarginines	RRRRRRRRR (R ₉)
Tat ₄₉₋₅₇	RKKRRQRRR
Penetratin (Antennapedia)	RQIKIWFQNRRMKWKK
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
Nuclear localization sequences	VQRKRQKLMP SKKKKIKV GRKKRKRT

¹Kelly M. Stewart, Kristin L. Horton and Shana O. Kelley, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 2242.

La poliarginina es un oligopéptido hidrofílico y catiónico que mantiene su carga positiva en casi la totalidad del rango de pH debido al fuerte carácter alcalino de sus grupos guanidino. El alto porcentaje de aminoácidos catiónicos son los que confieren la capacidad para atravesar la membrana plasmática de las células. A pesar de la gran variedad de secuencias de aminoácidos, los CPPs poseen, generalmente secuencias cortas, ricas en aminoácidos básicos, como la lisina y la arginina. Estos péptidos básicos pueden ser neutralizados mediante la captación de los contraiones aniones de cierta hidrofobicidad (por ejemplo, lípidos aniónicos). La arginina resulta más ventajosa que la lisina, ya que la primera no se desprotona a pH fisiológico y puede unirse a un contraión, mientras que la lisina puede liberar un protón y reducir al mínimo la repulsión (**Figura 1**)².

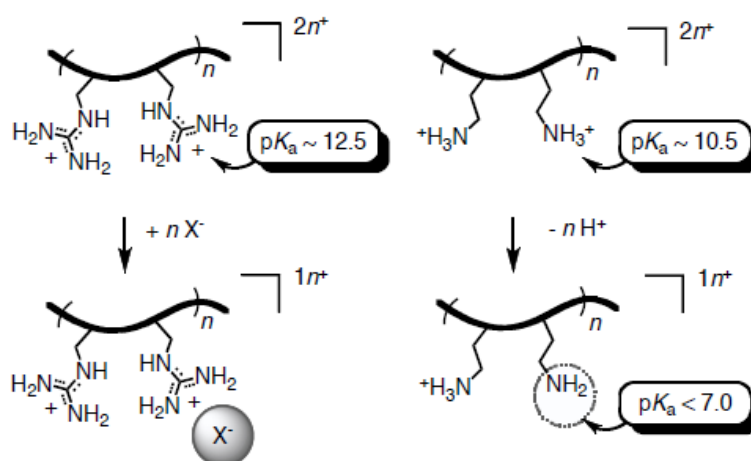


Figura 1. La polilisina $pK_a=10,5$ suele perder algún protón a un pH cercano al fisiológico y de esta forma minimiza las repulsiones entre las cargas. La poliarginina con $pK_a=12,5$ no pierde los protones tan fácilmente por lo que para minimizar la repulsión entre las cargas se une a contraiones.

Se ha buscado la obtención de información sobre las reglas generales que regulan la captación de los péptidos penetrantes de membrana como por ejemplo los efectos de la longitud del péptido o las propiedades químicas. Con este fin, numerosas investigaciones se han llevado a cabo para dilucidar el mecanismo de internalización de los CPPs.

El transporte de moléculas polares e iones a través de membrana requiere de la participación de multitud de proteínas de forma natural, como pueden ser los canales iónicos y la endocitosis entre otras. La importancia de incorporar de forma efectiva y selectiva en el interior celular a un determinado tipo de moléculas ha llevado al desarrollo de alternativas, dentro de las cuales se incluyen los CPPs³. No existe consenso sobre el mecanismo de transporte de los CPPs, pero se puede agrupar en tres principales métodos de entrada: **la permeación directa, la entrada mediada por endocitosis y la translocación a través de la formación de una estructura transitoria**¹.

²Takeuchi T.; Sakai N. and Matile S., Counterion-activated polyions as soft sensing systems in lipid bilayer membranes: From cell-penetrating peptides to DNA, *Faraday Discuss*, **2009**, 143, 187.

³Kadonosono, T.; Yamano, A.; Goto, T.; Tsubaki, T.; Niibori, M.; Kuchimaru, T.; Kizaka-Kondoh, S., Cell penetrating peptides improve tumor delivery of cargos through neuropilin-1-dependent extravasation, *J. Control. Release*, **2015**, 201, 14.

2.1.1 Penetración directa

La mayoría de las investigaciones iniciales sugerían que la translocación de los CPPs policatiónicos a través de la membrana biológica ocurría a través de un proceso celular independiente de energía. Se creía que lo más seguro es que la translocación involucraba una interacción electrostática directa con fosfolípidos cargados de forma negativa. Diferentes investigadores propusieron varios modelos en un intento de elucidar el mecanismo biofísico de este proceso, y aunque los CPPs promueven efectos directos en las propiedades biofísicas de la membrana, la utilización de sondas marcadas fluorescentemente causó que se hiciera una reevaluación del mecanismo de importación de los CPPs. Estos estudios promueven la endocitosis como la vía para la translocación.

Se ha propuesto un ejemplo de penetración directa para *Tat*, este modelo se basa en la interacción del péptido *Tat* con la membrana plasmática por medio de interacciones electrostáticas, generándose una deformación en la membrana suficiente como para permitir su entrada. Sin embargo en los últimos años se ha demostrado que en muchos de los casos en los que se observaba una penetración directa, lo que realmente tenía lugar era un artefacto debido a la distribución citoplasmática de los CPPs después de fijar las células para su observación en el microscopio. Recientemente, en modelos de células vivas sin fijar, se ha establecido un modelo detallado para la posible translocación directa a través de la membrana; este mecanismo involucra interacciones fuertes entre los CPPs y los grupos fosfato de la bicapa lipídica, la inserción de cadenas laterales con cargas que producen la formación de un poro transitorio, y la translocación del péptido al difundirse por la superficie del poro. Este mecanismo explica la gran importancia de la cooperatividad entre péptidos, la gran carga positiva, así como las fluctuaciones membranales para la contribución a la admisión. Este modelo contiene muchas características con controversia, aunque algunos datos experimentales recientes validan este modelo mostrando que los CPPs generan los poros de transición en la bicapa lipídica¹.

2.1.2 Translocación mediada por endocitosis

La endocitosis es otro de los mecanismos responsables de la internalización celular. La endocitosis incluye la fagocitosis y la pinocitosis, y es un proceso de regulación que utilizan las células para la internalización de solutos y fluidos del medio extracelular, es decir, es el proceso de la ingestión celular con la cual la membrana plasmática se pliega hacia el interior para aportar diferentes sustancias a la célula. La fagocitosis se lleva a cabo en células especializadas (macrófagos y neutrófilos) y es un proceso complejo para la internalización de grandes partículas. En cambio la pinocitosis tiene lugar en todo tipo de células y puede ser clasificado en cuatro tipos de vías: macropinocitosis, dependiente de clatrina, dependiente de caveolina/balsas lipídicas y endocitosis independiente de clatrina/caveolina.

Si bien el mecanismo de cada uno de estos procesos de pinocitosis difiere respecto a la estructura de la vesícula, así como la maquinaria utilizada, todos ellos presentan un resultado común: moléculas extracelulares son encapsuladas en vesículas lipídicas que se internalizan tras el sellado de la membrana plasmática¹.

El destino de las moléculas dependerá de su habilidad para escapar de las vesículas lipídicas antes de que sean recicladas a la membrana plasmática o se fusionen con los lisosomas; estos mecanismos de escape vesicular pueden limitar las aplicaciones de los CPPs como moléculas transportadoras o de captación, al impedir que la carga alcance el sitio intercelular deseado. Los diferentes estudios han mostrado que la endocitosis está involucrada en la internalización de CPPs, pero se ha sugerido que diferentes mecanismos pueden ocurrir al mismo tiempo¹.

2.1.3 Translocación mediante la formación de estructuras transitorias

Este mecanismo puede implicar la formación de micelas invertidas, es decir, la formación de agregados donde los grupos polares se concentran en el interior y los grupos lipofílicos se extienden afuera hacia el solvente.

Otro mecanismo de generación de estructuras transitorias implica que la internalización ocurre por péptidos que pertenecen a la familia de péptidos anfipáticos primarios, *MPG* y *Pep-1*. Dos modelos muy similares se han propuesto basados en estudios fisicoquímicos, que constan de una caracterización basada en estudios de dicroísmo circular, espectroscopia infrarroja con transformada de fourier, y una espectroscopia de resonancia magnética nuclear. En el modelo *MPG*, el poro se forma por una estructura β -barril, mientras que en el *Pep-1* está asociada con hélices α . Fuertes interacciones hidrofóbicas fosfolípido-péptido se han descubierto en ambos modelos¹.

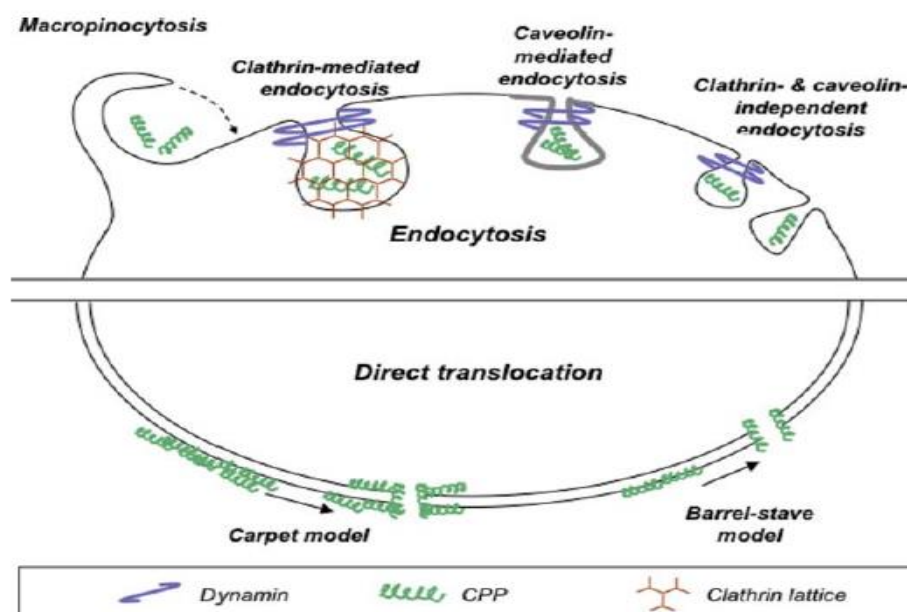


Figura 2. Mecanismos de captación mediada por CPPs a través de la membrana plasmática.

Las evidencias muestran que la translocación puede ocurrir por múltiples y diferentes mecanismos para dar lugar a la internalización. Además, los mecanismos de translocación pueden depender si los péptidos se encuentran libres o adheridos a la carga. Es probable que los múltiples mecanismos de captación de los CPPs estén en competencia y que diferentes vías contribuyan al mismo tiempo la internalización de los péptidos penetrantes¹.

2.2 Aplicaciones de los péptidos penetrantes de membrana (CPPs)

Se han realizado múltiples estudios con el objetivo de caracterizar y optimizar los CPPs como agentes de liberación celular capaces de transportar diferentes cargas moleculares. El trabajo conjunto entre químicos y biólogos ha permitido desarrollar numerosas estructuras peptídicas diferentes con el fin de clarificar los factores moleculares más importantes que modulan la actividad de los CPPs.

Una gran variedad de cargas han sido transportadas por los CPPs como por ejemplo nucleótidos, polímeros, nanopartículas, liposomas, péptidos y proteínas. Las más relevantes son aquellas en las que las macromoléculas funcionan como agentes terapéuticos. Los CPPs tienen numerosas aplicaciones en medicina como agentes de administración de fármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades, incluyendo al cáncer, inhibidores virales, así como agentes de contraste para marcar células. Por consiguiente, los CPPs son una poderosa herramienta para el transporte de diversos materiales a través de la membrana celular y han atraído el interés de la comunidad científica¹.

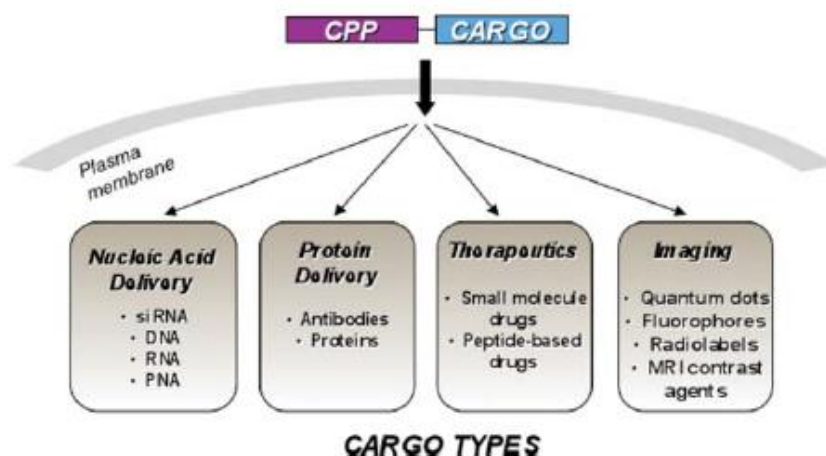


Figura 3. Aplicaciones de los péptidos penetrantes de membrana como vehículos de liberación molecular.

Algunos CPPs también están siendo estudiados como agentes terapéuticos debido a sus propiedades antimicrobianas. La resistencia de las bacterias a los agentes antimicrobianos es un fenómeno recurrente en los tratamientos contra todo tipo de infecciones⁴. De hecho se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud de hoy en día, hasta el punto de haber advertencias sobre infecciones por las llamadas superbacterias (esterococos resistentes a la vancomicina-VRE o aureus meticilina estafilococos-SARM⁵) que pueden haber llegado a niveles que superan nuestra capacidad para luchar contra ellos con los antibióticos existentes.

⁴O'Connell, K.M.G.; Hodgkinson, J.T.; Sore, H.F.; Welch, M.; Salmond, G.P.C.; Spring, D.R., Combating multidrug-resistant bacteria: Current strategies for the discovery of novel antibacterials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 1070.

⁵Rodríguez-Vázquez, N.; Ozores, H. L.; Guerra, A.; González-Freire, E.; Fuertes, A.; Panciera, M.; Priegue, J.M.; Outeiral, J.; Montenegro J.; García-Fandiño, R.; Amorín, M. and Granja, J.R., Membrane-Targeted Self-Assembling Cyclic Peptide Nanotubes. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2014**, 14, 2647

El problema se agrava por la dificultad y el coste asociados con el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos con nuevos modos de acción; por ello, sólo cuatro nuevas clases de antibióticos se han aprobado (para su uso comercial) en los últimos 40 años. Uno de los enfoques para combatir estas limitaciones se basa en péptidos antimicrobianos naturales, sin embargo, entre la variedad de péptidos antimicrobianos (AMPs) estudiados hasta la fecha, sólo unos pocos han pasado a las aplicaciones clínicas⁵.

2.3 Conceptos previos

2.3.1 El enlace peptídico

Un aminoácido es una molécula orgánica con un grupo amino ($-NH_2$), un grupo carboxilo ($-COOH$), un átomo de hidrógeno ($-H$) y un grupo de cadena lateral ($-R$), el cual puede ser arilo o alquilo y contener una gran variedad de grupos funcionales, siendo el grupo lateral el que confiere propiedades químicas diferentes a cada uno de ellos⁶.

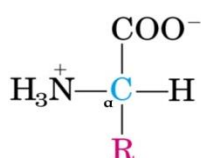


Figura 4. Estructura química de un aminoácido general.

Los aminoácidos naturales son los 2-aminoácidos o α - *aminoácidos*, es decir con la función amino situada en el C_2 , en α al grupo ácido. Todos ellos pertenecen a la serie *L*, es decir que todos sus carbonos α tienen la misma estereoquímica y, por tanto, las cadenas laterales se encuentran orientadas todas en el mismo sentido. Los aminoácidos son sólidos cristalinos no volátiles que se funden por descomposición a temperaturas elevadas, son insolubles en disolventes no polares pero apreciablemente solubles en agua. Dependiendo de la naturaleza química de las cadenas laterales se pueden clasificar a los aminoácidos en: **no polares** (*G, A, V, L, I, M, P*), **aromáticos** (*F, Y, W*), **polares no iónicos** (*S, T, N, Q, C*), **ácidos** (*D, E*) y **básicos** (*K, R, H*). En *Anexo I* se encuentra representada la estructura química y el código de una y tres letras de estos aminoácidos⁶.

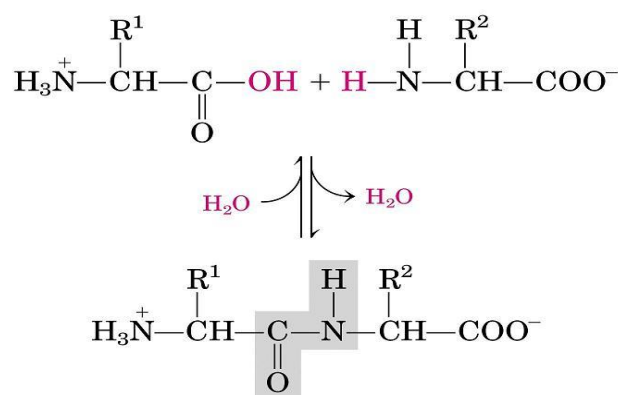


Figura 5. Formación del enlace peptídico por condensación entre un grupo ácido y un grupo amino.

⁶Stryer L.; Berg J. M.; Tymoczko J. L. Bioquímica. Editorial Reverté, edición en español 2014.

Los aminoácidos integran las unidades monoméricas de los péptidos, resultado de la reacción repetitiva del grupo carboxilo de un monómero con la función amino de otro con eliminación de una molécula de agua; este enlace amida que los une se denomina **enlace peptídico** (enlace covalente, enlace amida sustituido) ⁷⁻⁸.

El enlace peptídico ($C - N$) es más corto que un enlace sencillo normal, debido a que presenta cierto carácter de doble enlace (60%). Este carácter parcial de doble enlace viene dado gracias a su estabilización por resonancia, debido a la conjugación del par no compartido del nitrógeno de la amida con el grupo carbonilo ⁹⁻¹⁰.



Figura 6. Estructuras de resonancia del enlace peptídico.

Esta estabilización obliga a que los cuatro átomos que forman el enlace peptídico y los dos carbonos que se encuentran en posición α a este enlace, se encuentren en un plano paralelo. Por este motivo, y debido al carácter de doble enlace, un aspecto fundamental de la estructura de los polipéptidos es el hecho de que el enlace peptídico sea plano y relativamente rígido a temperatura ambiente. El enlace $N - H$ está situado en *trans* respecto al enlace $C - O$ y la rotación sobre el enlace $C - N$ está totalmente impedida debido a que presenta carácter parcial de doble enlace. Además esta estabilización también provoca el momento dipolar del enlace peptídico, aportándole polaridad, lo que le permite formar enlaces de hidrógeno ⁹⁻¹⁰.

En cuanto al giro de los enlaces de los carbonos alfa (C_α), pueden establecerse dos ángulos de torsión con los planos de los enlaces peptídicos contiguos: **El ángulo ϕ** es la rotación en torno al enlace $C - N$, y **el ángulo ψ** es la rotación en torno al enlace $C - C$ ¹¹.

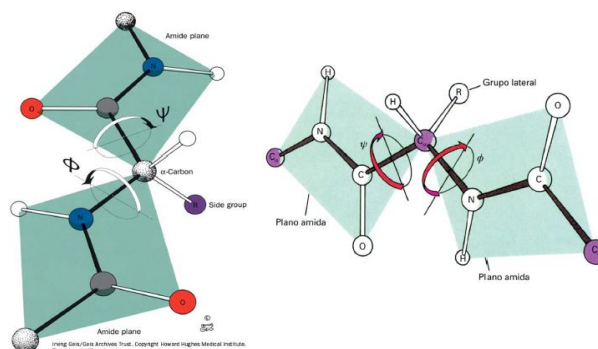


Figura 7. Ángulos de torsión con los planos de los enlaces peptídicos continuos.

⁷Fields, G. B.; Lauer-Fields, J. L.; Liu, R.; Barany, G. Principles and practice of solid-phase peptide synthesis in synthetic peptides, *Oxford University Press: New York*, **2002**; 93.

⁸Sewald, N.; Jakubke, H-D., Peptides: Chemistry and Biology, *Wiley-VCH: Weinheim*, **2002**.

⁹Stryer L.; Berg J. M.; Tymoczko J. L. Bioquímica. *Editorial Reverté*, edición en español **2014**.

¹⁰Lehninger. Principios de Bioquímica. Nelson & Cox. Quinta edición. *Editorial Omega*. **2009**.

¹¹Kabsch, W.; Sander, C., Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers*, **1983**, 22, 2577.

Los péptidos presentan dos extremos, el grupo amino que se coloca a la izquierda y se conoce como extremo *N – terminal*, y el grupo carboxilo, el cual se coloca a la derecha y se conoce como extremo *C – terminal*. Según el número de aminoácidos que presente el péptido puede ser un **oligopéptido** (2 Aa a 20 Aa), **polipéptido** (20 Aa a 100 Aa) o **proteína** (+100 Aa). Las unidades individuales de aminoácido que forman el péptido se denominan residuos⁹⁻¹⁰.

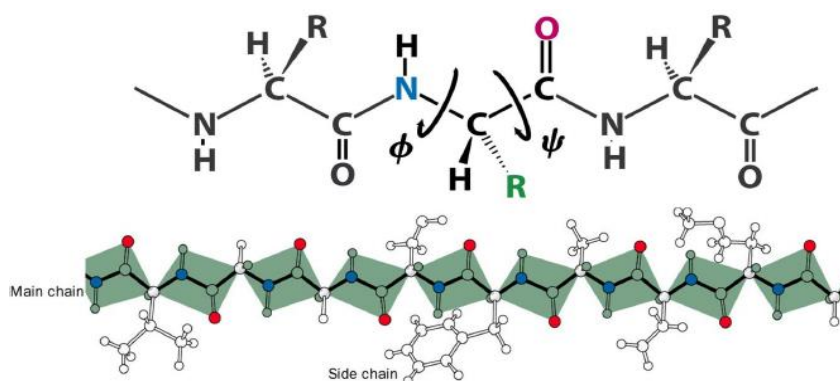


Figura 8. Extremos *N-terminal* y *C-terminal* de un péptido

2.3.2 Estructura de las proteínas

Las proteínas forman una cadena polipeptídica lineal que se pliega para formar estructuras tridimensionales que determinan sus funciones biológicas. Las proteínas están integradas por una **estructura primaria** que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la proteína, el orden, y el número de aminoácidos enlazados mediante el enlace peptídico. Esta estructura primaria condiciona al resto de estructuras, su conformación espacial, la localización celular y la función biológica que va a desarrollar. Su función depende de su conformación nativa, la más estable y la que presenta un mayor número de interacciones intramoleculares. La fuerza predominante y la que primero determina el plegamiento de una proteína es el efecto hidrofóbico; los enlaces de hidrógeno, los puentes disulfuro y las interacciones débiles. La alteración de la estructura primaria por adición, eliminación o intercambio de aminoácidos cambia la configuración general y da lugar a una proteína diferente¹².

Esta estructura primaria puede generar estructuras locales, es decir, que se encuentran únicamente en ciertas regiones de la cadena polipeptídica de la proteína, que se mantienen debido a las interacciones entre aminoácidos cercanos en la secuencia polipeptídica; este plegamiento local genera patrones conocidos como las hélices α , giros, láminas β etc. El conjunto de estos elementos estructurales es lo que se conoce como la **estructura secundaria** de la proteína. Los elementos de estructura secundaria se caracterizan por valores concretos en los ángulos de torsión ψ y ϕ según las torsiones en torno al carbono α , dos de estos elementos, las hélices α y las láminas β , fueron predichas por Linus Pauling y Robert Corey en 1951 basándose en criterios de formación de enlaces de hidrógeno y criterios de cooperatividad. Posteriormente serían confirmadas en las primeras estructuras cristalinas con resolución atómica¹¹.

¹²Hecht, S. M., Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins. Oxford University Press: New York, 1998.

Un aspecto de gran relevancia en la memoria, es la adquisición de estructura secundaria de hélice α de los péptidos diseñados. La *hélice alfa* (*hélice 3,6* o *hélice 3,6₁₃*) es la forma más simple y común de estructura secundaria, es un helicoide dextrógiro muy estable con los radicales de cadena lateral situados hacia el exterior. Se produce una vuelta cada 3,6 aminoácidos; la traslación media por residuo es de 1.5 Å, por lo que una vuelta completa de hélice representa una distancia de 5,4Å¹³.

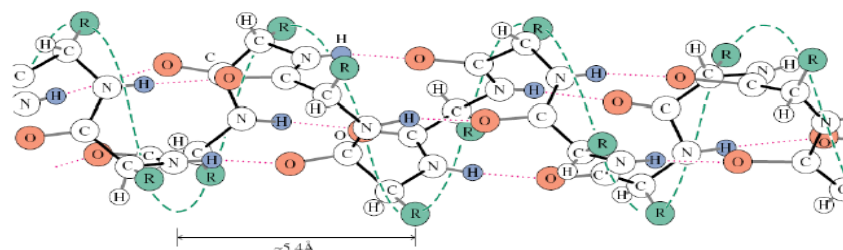


Figura 9. Estructura secundaria de hélice α de una proteína, cohesiona gracias a los enlaces de hidrógeno y en donde los grupos R de cadena lateral se encuentran orientados hacia el exterior de la hélice

La estructura de hélice alfa se mantiene gracias a los puentes de hidrógeno intramoleculares u otras interacciones no covalentes, entre el oxígeno del grupo carboxilo y el hidrógeno del grupo amino situado cuatro residuos más adelante en la cadena lineal primaria. Estos puentes de hidrógeno introducen un nuevo parámetro en las estructuras helicoidales, ya que forman un bucle en el interior de la hélice de 13 átomos. Existen variantes de la hélice alfa que adoptan un patrón distinto a la hora de establecer enlaces de hidrógeno¹³.

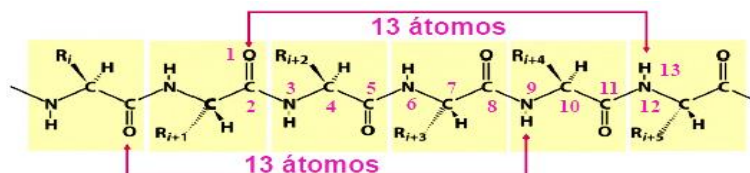


Figura 10. Interacción del oxígeno del grupo carboxilo de un aminoácido con el hidrógeno del grupo amino de un aminoácido situado cuatro residuos más adelantados para la formación del enlace de hidrógeno, así como el número de átomos entre cada interacción de enlace de hidrógeno.

Dentro de las hélices alfa, distinguimos un tipo particular de estructuras, las denominadas estructuras superhelicoidales o superenrolladas (coiled-coils) las cuales son estructuras de proteínas en donde de 2 a 7 hélices alfa se enrollan juntas generando una estructura terciaria de mayor complejidad, siendo los dímeros y los trímeros las formas más comunes. Muchas proteínas tipo hélice superenrolladas están involucradas en importantes funciones biológicas.

La **estructura terciaria** hace referencia al plegamiento adicional de la estructura secundaria en el espacio, a la organización en el espacio de los diferentes elementos de la estructura secundaria. La estructura terciaria se estabiliza por enlaces covalentes como los puentes disulfuro, y por medio de interacciones débiles (enlaces de hidrógeno, interacciones ácido-base, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de London, las atracciones y repulsiones electrostáticas) entre los grupos R de cadena lateral de los aminoácidos.

¹³Nishikawa, K., Radial locations of amino-acid residues in a globular protein - correlation with the sequence, *J. Biochem.*, **1986**, 100, 1043.

Los aminoácidos se disponen en función de su afinidad con el medio (efecto hidrofóbico), de tal forma que el polipéptido adopta una forma tal que la exposición de los grupos polares al entorno acuoso sea máxima, a la vez que se minimiza la exposición de los grupos hidrofóbicos, los cuales tienden a situarse cara el interior de la proteína. Distinguimos dos formas básicas de estructuras terciarias: las estructuras fibrosas o filamentosas y las estructuras globulares¹³.

Finalmente, la **estructura cuaternaria** se refiere a la asociación entre unidades estructurales independientes, resulta de la unión mediante enlaces débiles no covalentes de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria; asociación de diferentes cadenas polipeptídicas entre sí para dar lugar a proteínas multiméricas complejas.

Por lo tanto, no solamente es necesario conocer la estructura primaria de una proteína, sino que hay que considerar también sus estructuras secundarias, terciarias e incluso, si la proteína está formada por varias subunidades, su estructura cuaternaria, para entender la estructura del complejo multimérico así como su función.

2.3.3 Reconocimiento de azúcares

La interacción proteína-carbohidrato es un paso clave en muchos procesos biológicos y eventos patológicos y fisiológicos, este reconocimiento es, en varios casos, uno de los primeros pasos selectivos que desencadenan una serie de procesos biológicos que conducen a funciones biológicas. Esta interacción se caracteriza por una alta selectividad y una dependencia de cationes divalentes, en la mayoría de los casos de calcio y magnesio¹⁴.

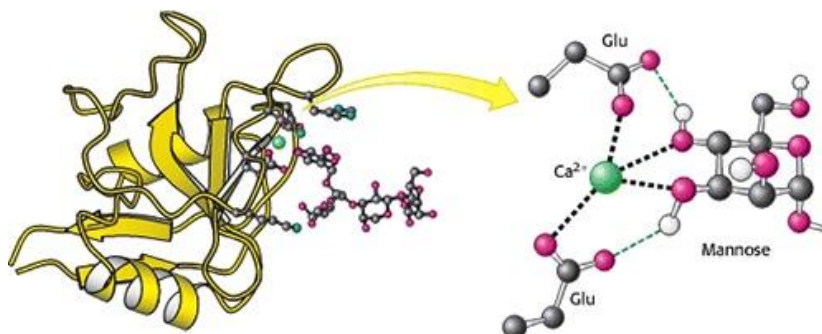


Figura 11. Interacción proteína-carbohidrato dependiente de cationes divalentes (Ca^{+2} y Mg^{+2}) para el reconocimiento de azúcares.

Las lectinas son una amplia gama de proteínas de origen animal y vegetal que se unen a moléculas de azúcares con una elevada especificidad, con un papel fundamental en los fenómenos de reconocimiento de carbohidratos tanto a nivel molecular como celular. Debido a esta propiedad las lectinas pueden aglutinar glucoconjugados e incluso aglutinar células que los posean en la superficie. De los últimos descubrimientos efectuados sobre las lectinas, uno de los más impactantes fue la comprobación de que podían diferenciar células cancerosas de las normales por lo que surgió inmediatamente su uso terapéutico.

¹⁴ Sánchez N. M.; Muñoz A.; Illescas B. M.; Rojo J. and Martín N.; Fullerene as Multivalent Scaffold Efficient Molecular Recognition of Globular Glycofullerenes by Concanavalina A, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 766.

Cuando se comenzó a estudiar las lectinas se las consideró como anticuerpos vegetales, sin embargo esta hipótesis no es cierta por varias razones:

- Los anticuerpos son el producto del sistema inmune de los animales superiores en respuesta a un estímulo de una sustancia extraña. Las lectinas se encuentran presentes como proteínas constituyentes del organismo (y en muchos organismos son incapaces de generar respuesta inmune)
- La especificidad de los anticuerpos es más amplia que la de las lectinas
- En cuanto a su estructura química, mientras que los anticuerpos presentan una estructura similar, las lectinas no guarda ninguna relación e incluso difieren mucho entre sí generando una superfamilia de inmunoglobulinas.

En el caso de la Concanavalina A se encontró que estaba compuesta de subunidades dispuestas asimétricamente, de peso molecular 25.500 g/mol , unidas como dímeros tetrámeros y formas de alto peso molecular dependientes del pH. Cada cadena posee una secuencia de 238 aminoácidos y la molécula de Con-A presenta una estructura globular.

2.3.4 Estudios de dicroísmo circular

Para poder determinar la conformación de las estructuras peptídicas se utiliza la técnica de dicroísmo circular. Esta técnica se basa en hacer pasar luz polarizada circularmente de izquierda a derecha sobre compuestos ópticamente activos¹⁵. Esta técnica da información sobre las estructuras secundarias quirales de las macromoléculas biológicas.

En la siguiente figura se representan los espectros característicos de un péptido con estructura helicoidal (dos bandas negativas a 208 y 222 nm) lámina β (una banda negativa a 215 nm) o random coil (una banda negativa a 200 nm).

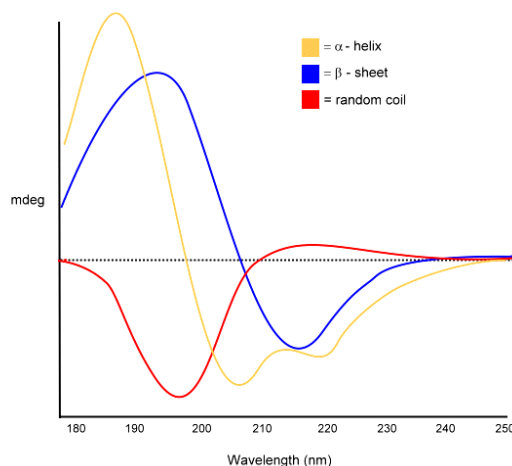


Figura 12. Espectros de dicroísmo circular para distintas estructuras secundarias peptídicas

Estos experimentos se pueden realizar en distintos disolventes aportando información sobre la estabilidad y las condiciones más adecuadas para que se produzca el plegamiento. Una de las grandes ventajas de este método es que se puede cuantificar el porcentaje de helicidad usando la **fórmula 1**.

¹⁵Greenfield, J.N. *Nat. Prot.* **2006**, *1*, 2876.

$$\%hel_{222} = \frac{(\theta - 2340)}{30300} * 100$$

Fórmula 1. Fórmula para calcular el porcentaje de helicidad.

2.3.5 Síntesis peptídica en fase sólida

La síntesis orgánica en fase sólida fue desarrollada originalmente para la preparación de péptidos por R.B. Merrifield en 1963¹⁶. Esta técnica se basa en el uso de una resina, generalmente de poliestireno en forma de pequeñas esferas que es insoluble en casi todos los solventes. La utilización de disolventes adecuados hace que estas se solvaten (se hinchen) consiguiendo una buena exposición de los grupos químicos anclados en la resina para su posterior funcionalización. Mientras que la síntesis orgánica en disolución involucra procesos laboriosos de purificación y aislamiento (extracción, cromatografía y cristalización), la síntesis en fase sólida permite que las reacciones sean cuantitativas en cada etapa gracias a que es posible utilizar un exceso de los reactivos, ya que se pueden eliminar fácilmente una vez finalizada la reacción por procesos simples de lavado y filtrado. Finalmente, el producto deseado se desprende del soporte, y su purificación y caracterización se llevan a cabo en disolución. En consecuencia, no hay que purificar cada intermedio sintético, lo que se traducirá en una reducción de tiempo y un aumento en la producción.

Sin embargo, existe un problema importante a tener en cuenta en esta técnica, las reacciones no transcurren con rendimientos cuantitativos. Esto es, si cualquier residuo N-terminal de una de las muchas cadenas polipeptídicas en crecimiento adheridas a la resina permanece sin acilar después de la etapa de acoplamiento, esto lleva a que el producto final esté contaminado por secuencias incompletas. En este caso se dan dos situaciones: el residuo puede ser exitosamente acoplado en el siguiente ciclo, resultando en un péptido suprimido, o el residuo puede no ser acoplado subsecuentemente, lo que dará un péptido truncado¹⁷.

Este problema puede solucionarse forzando a que cada etapa de acoplamiento se lleve a cabo en su totalidad. Para ello suele usarse un exceso del agente acilante, utilizar agentes de acoplamiento más reactivos, cambiar el disolvente e incluso repetir esta etapa más de una vez. Desgraciadamente la síntesis tampoco puede ser seguida con facilidad por las técnicas utilizadas en disolución, sobre todo el RMN. Es por ello que se han desarrollado diferentes agentes que permiten comprobar si la etapa no se ha completado en su totalidad con pruebas como el test de Kaiser¹⁸. El test TNBS, es otro de esos métodos y es el que será empleado en este caso. El ensayo de TNBS es más fácil de realizar y de una sensibilidad casi equivalente a la del ensayo de Kaiser y solamente es utilizado para la detección de grupos amino primarios.

¹⁶a) Merrifield, R. B.; Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149. b) Merrifield, R. B., Automated synthesis of peptides, *Science*, **1965**, 150, 178.

¹⁷a) Dick, F., Acid cleavage/deprotection in Fmoc/t-Bu Solid-Phase Peptide Synthesis, Peptide Synthesis Protocols, *Humana Press*, **1994**. b) Pennington, M. W.; Byrnes, M. E., Procedures to Improve Difficult Couplings. Peptide Synthesis Protocols, *Humana Press*, **1994**. c) Atherton, E., Sheppard, R. C. Solid-phase peptide synthesis: *A practical Approach*. **1989**

¹⁸Kaiser, E.; Collescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595.

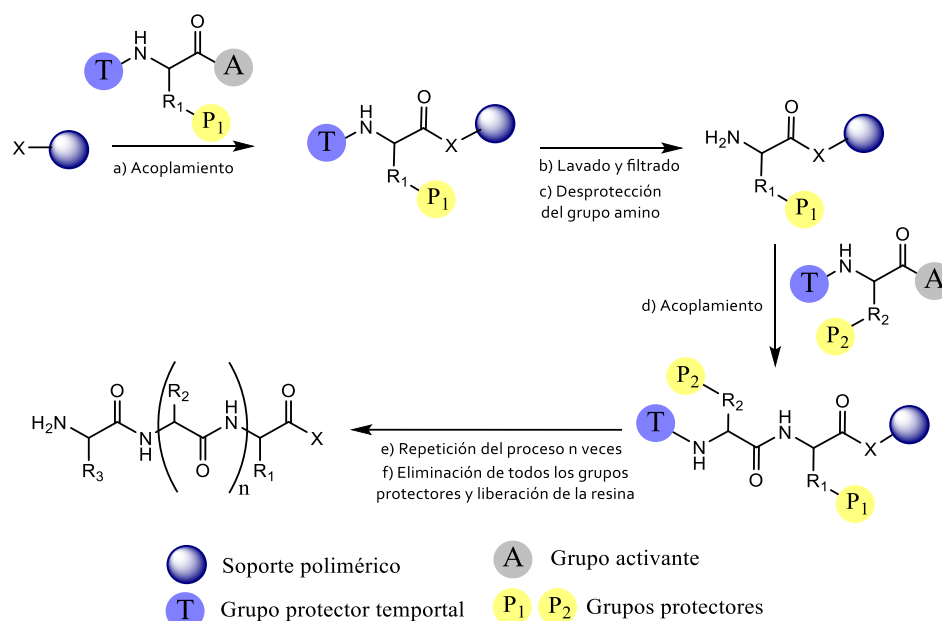
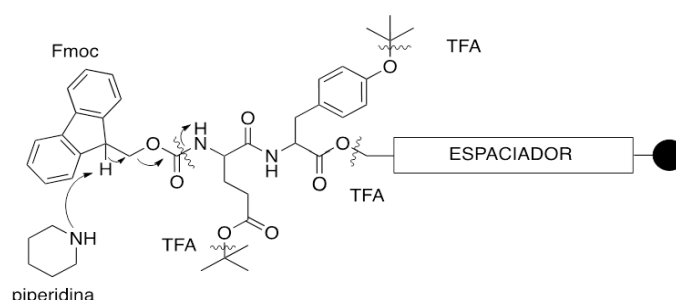


Figura 13. Esquema de la metodología empleada en la síntesis en fase sólida. P1 y P2 son los grupos protectores ortogonales permanentes de las cadenas laterales de los aminoácidos que lo requieran a lo largo de la síntesis. T denota un grupo protector temporal utilizado en el extremo N-terminal.

2.3.6 Síntesis peptídica en fase sólida mediante el método Fmoc

La metodología más empleada en la síntesis peptídica en fase sólida es la estrategia *Fmoc*/^tBu¹⁹ que emplea condiciones más suaves a las utilizadas en la estrategia *Boc*/*Bzl*, en la que el tratamiento continuado con *TFA* puede acabar por alterar los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y requiere de un tratamiento ácido muy fuerte, generalmente con *HF* al final del proceso. Por tanto, la capacidad del *HF* o *TFA* para degradar las proteínas en las condiciones del desanclaje final condujo a la introducción de un nuevo protector del grupo amino, basado en el 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (*Fmoc*), que requiere una acción de desprotección y liberación del péptido más suave.

Este método utiliza una base, normalmente la piperidina (20 %) en *DMF* para la eliminación del grupo *Fmoc*, quedando el grupo amino libre y listo para reaccionar con un nuevo aminoácido activo. Los grupos protectores temporales de las cadenas laterales de los aminoácidos se basan en el grupo *terc*-butilo. La separación del péptido de la resina y la eliminación de los grupos protectores ortogonales solo requiere del tratamiento con un medio ácido como el *TFA*.



¹⁹Chang, W. C.; White, P. D., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University: New York, 2000.

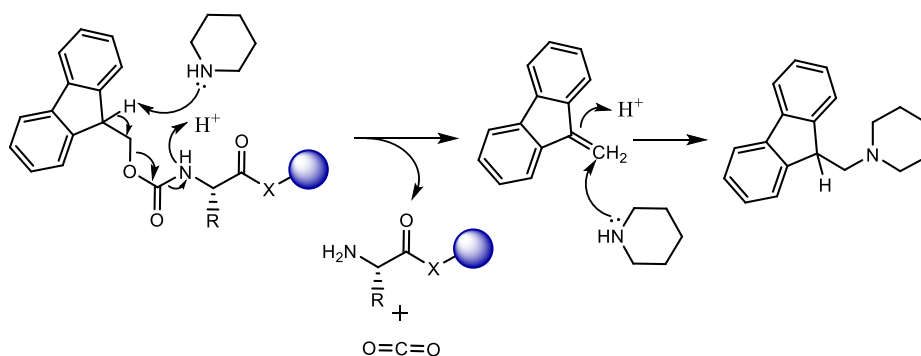


Figura 14. a) Reactivos y grupos protectores en la estrategia Fmoc/^tBu. El grupo Fmoc se desprotege por tratamiento con una disolución de piperidina al 20% en DMF. Las cadenas laterales se desprotegen simultáneamente a la liberación de la resina por tratamiento con TFA. b) Mecanismo de desprotección del grupo Fmoc situado en el extremo N-terminal de un aminoácido creciente sobre la resina.

Paralelamente al desarrollo del método Fmoc para la SPPS, se han creado diversas resinas que pueden ser tratadas con TFA para la liberación del péptido. Se usan dos resinas principalmente, dependiendo de la funcionalización deseada en el extremo C-terminal. La resina Wang es la más usada para péptidos con ácidos carboxílicos C-terminales, mientras que se utiliza la resina de Rink si se desea una amida C-terminal²⁰⁻²¹. La resina Rink es la seleccionada para la síntesis de los péptidos en esta memoria.

La etapa clave de la síntesis de péptidos es la formación de los enlaces amida entre los aminoácidos. La formación eficiente de estos enlaces requiere la activación del grupo carboxilo, existiendo diferentes formas de llevarla a cabo. El método más utilizado comúnmente se basa en la formación *in situ* de ésteres activos. Este método consiste en la activación del ácido en el mismo medio en el que está presente el grupo amino y sin aislar el intermedio reactivo generado. Esto permite llevar a cabo reacciones limpias y rápidas, incluso con aminoácidos de elevados impedimentos estéricos. Los reactivos encargados de la activación se denominan agentes de acoplamiento; siendo los siguientes algunos de los más utilizados.

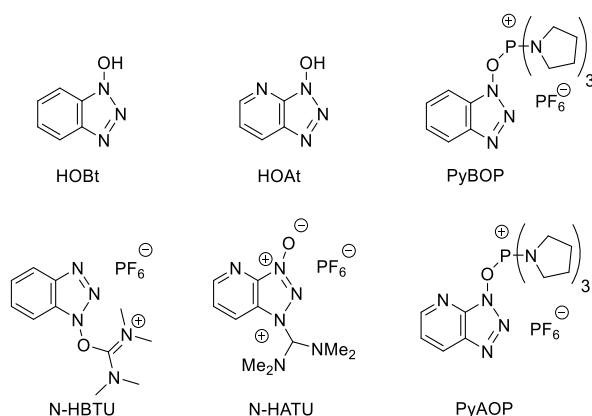


Figura 15. Agentes de acoplamiento más utilizados en la síntesis en fase sólida.

²⁰ Fields, G. B.; Noble, R. L.; Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl aminoacids, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161.

²¹ Alsina, J.; Albericio F., Solid-Phase synthesis of C-terminal modified peptides, *J. Pept. Science*, **2003**, 71, 454.

Los diversos agentes de acoplamiento presentan diferentes reactividades. El mecanismo de la reacción de activación se ejemplifica en el siguiente esquema para el *HBTU*. En este mecanismo se genera el éster "activo" que reacciona posteriormente con la amina libre.

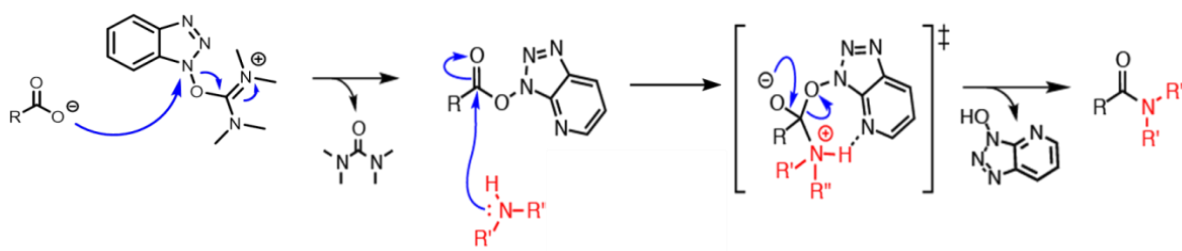


Figura 16. Mecanismo de reacción del reactivo de acoplamiento *HBTU* para la formación del éster activo y su posterior acoplamiento con el grupo amino para la formación del enlace amida entre aminoácidos.

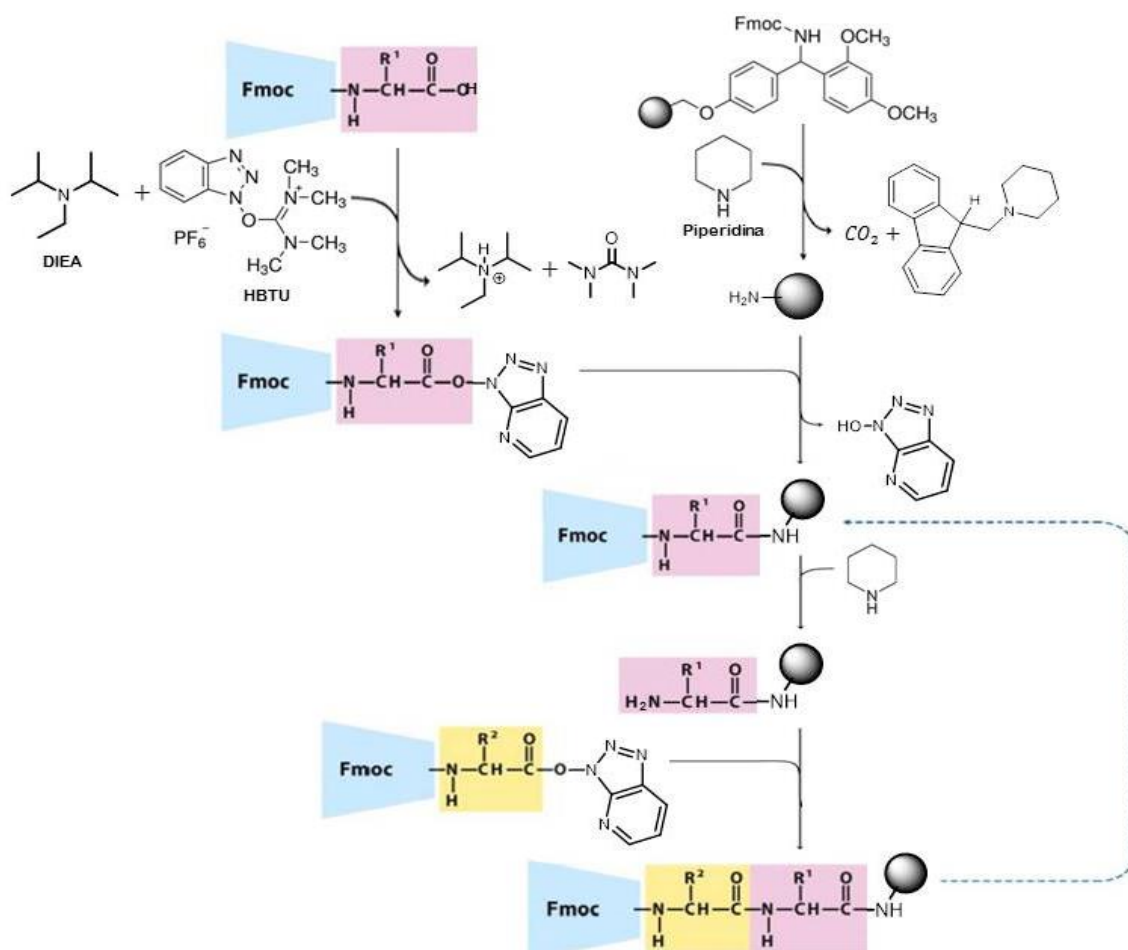


Figura 17. Esquema detallado de la metodología rutinaria para el acoplamiento de los diferentes aminoácidos y crecimiento del péptido sobre la resina. Este procedimiento se llevará a cabo *n* veces en función del número de aminoácidos que presente el péptido diseño que se crece sobre la resina.

El desanclaje final del péptido de la resina y la posterior eliminación de los grupos protectores permanentes son llevadas a cabo por el *TFA*. De este modo, el método *Fmoc* es ortogonal en dos direcciones, es decir, la desprotección del grupo amino y el desanclaje final de la resina.

3. Objetivos

Recientemente se ha descubierto que ciertos dominios de péptidos ricos en aminoácidos catiónicos son responsables del paso de proteínas a través de la membrana (CPPs, péptidos penetrantes de células). Por este motivo en este proyecto, se plantea la síntesis y el estudio de péptidos sencillos que contengan una parte catiónica (transportadora) y otra parte de unión (ligando) a una macromolécula (proteína) de interés. De esta forma, estos péptidos se unirían de forma no covalente a diferentes proteínas permitiendo el paso a través de la membrana y la internalización de la macromolécula, pudiendo liberarla una vez atravesada la membrana.

Tal y como se ha mencionado, los CPPs poseen la capacidad para atravesar las membranas celulares. Existe un gran número de péptidos que poseen esta propiedad aunque la mayoría de ellos se caracteriza por poseer un elevado número de residuos catiónicos (*Arg* o *Lys*) o bien por poseer un carácter anfipático en el que se alternan patrones polares (formados por residuos polares y/o catiónicos) con patrones hidrofóbicos (formados por residuos apolares).

El primer y más importante objetivo es la síntesis de diferentes péptidos sencillos **catiónicos** y que contengan **grupos reactivos (hidroxilaminas)** donde anclar un ligando que interaccione con la proteína de interés. Se estudiará la reactividad de estos compuestos con los correspondientes ligandos, donde la selección de estos depende del tipo de proteína que se va a transportar. En los primeros estudios se empleará la Concanavalina A como proteína, que reconoce azúcares sencillos (glucosa y manosa) con alta especificidad. La caracterización de estos compuestos se llevará a cabo mediante las más novedosas técnicas disponibles (RMN, MS, HPLC, Fluorescencia).

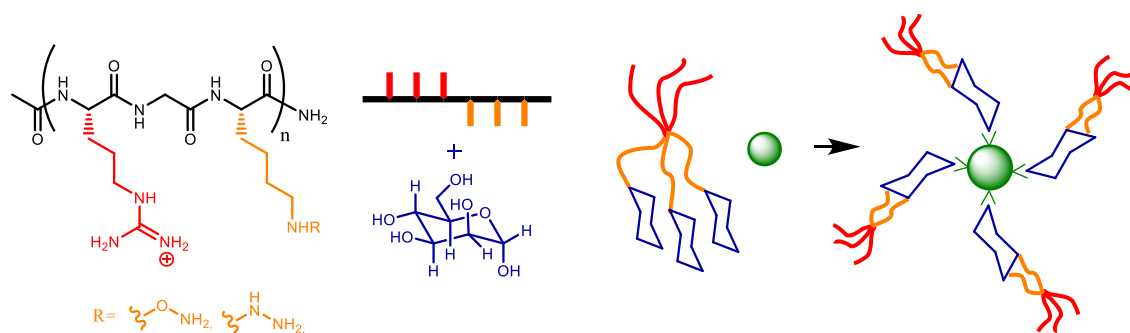


Figura 18. Esquema simplificado de la estructura del péptido y la formación del complejo transportable que permita la internalización de la proteína de interés.

En posteriores etapas, una vez ensambladas las dos partes del péptido (transportadora y ligando) el siguiente objetivo es evaluar el transporte de la proteína seleccionada (o macromolécula) mediante marcaje fluorescente de la misma; la consecución de este objetivo permitirá abordar el transporte de nuevas proteínas en células con posibilidades terapéuticas. El control sobre la activación o la inhibición del tráfico proteico resultará una herramienta enormemente poderosa tanto para el tratamiento como el diagnóstico de enfermedades.

4. Discusión de resultados

4.1 Diseño general de la estructura del péptido

Para comenzar es necesario diseñar la estructura del péptido a sintetizar; para ello, y tal y como se mencionó anteriormente, se busca que el péptido de interés adquiera una estructura secundaria con una conformación de hélice α , que presente una parte catiónica y una parte reactiva donde se acoplen los ligandos de interés dependiendo del tipo de proteína que se quiera internalizar. Esta conformación en hélice α orienta los distintos dominios del péptido en diferentes regiones espaciales permitiendo llevar a cabo su función de manera efectiva.

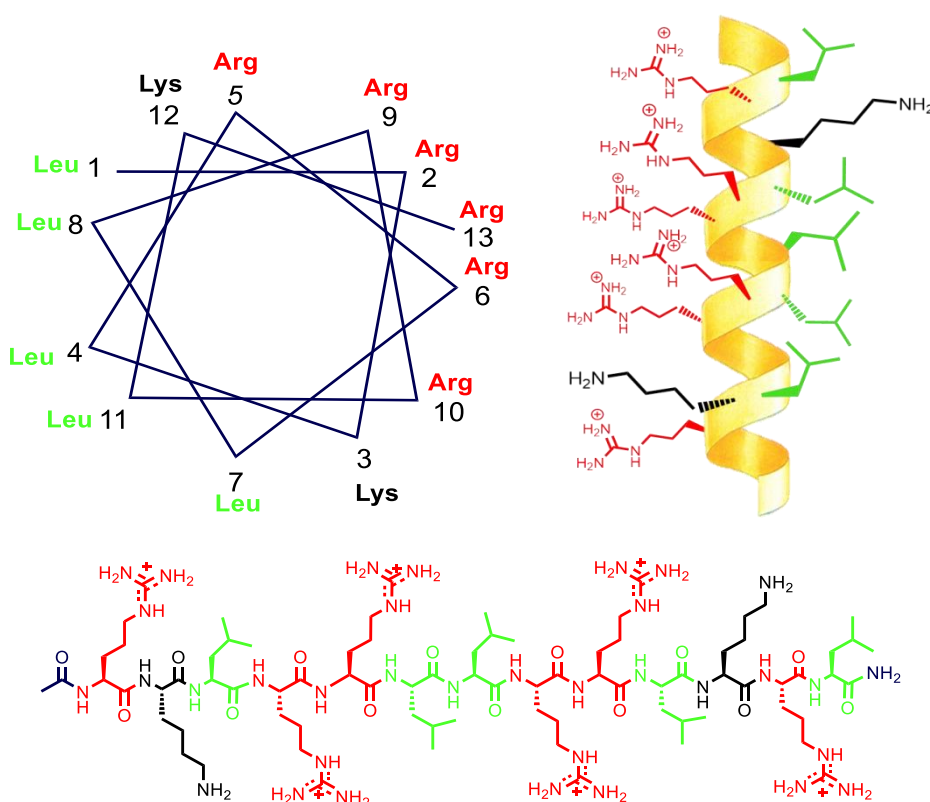


Figura 19. (a) Configuración en estrella de los aminoácidos, agrupados en diferentes regiones del péptido. (b) Configuración tridimensional en hélice α , simulando las distintas regiones espaciales de cada dominio de acuerdo con el diseño inicial del péptido. (c) Estructura lineal del péptido a sintetizar.

En cuanto a la elección de los aminoácidos que formarán parte de la estructura de nuestro péptido, las **argininas** se encargan de aportar la parte catiónica al péptido que les permitirá actuar como péptidos penetrantes de membrana; las **leucinas** se encargan de aportar hidrofobicidad a la estructura, aspecto importante del que depende la configuración de hélice α . Por último, las **lisinas** actúan como soporte de unión para la estructura reactiva donde posteriormente se acoplará el ligando de interés. Tal y como se muestra en la **figura 19a**, estos residuos se encuentran hacia lados opuestos de la hélice con el fin de formar estructuras tridimensionales complejas (en redes) a la hora de interactuar con la proteína de interés.

Para el acoplamiento de los péptidos que contenían residuos de hidroxilamina con azúcares reductores como los que se muestran en la **figura 22**, se necesitó en todos los casos el calentamiento a 60°C durante 2 horas. En estas condiciones de reacción, se observó, mediante *HPLC*, la completa desaparición del producto de partida y la aparición de un único pico del producto final.

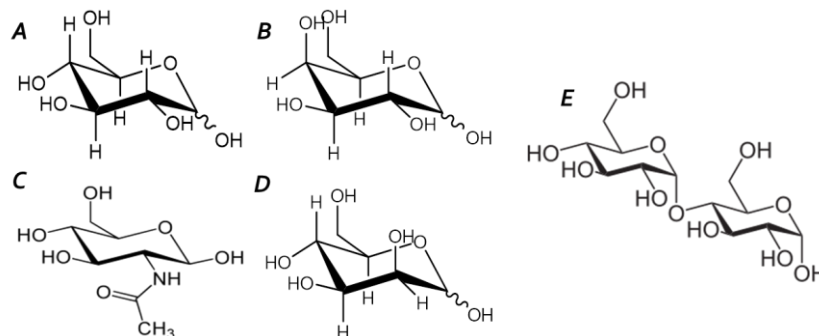


Figura 22. Estructura cíclica de los azúcares comerciales empleados para el acoplamiento al péptido 1 (A) D-glucosa (B) D-galactosa (C) N-acetilglucosamina (D) D-manosa (E) maltosa.

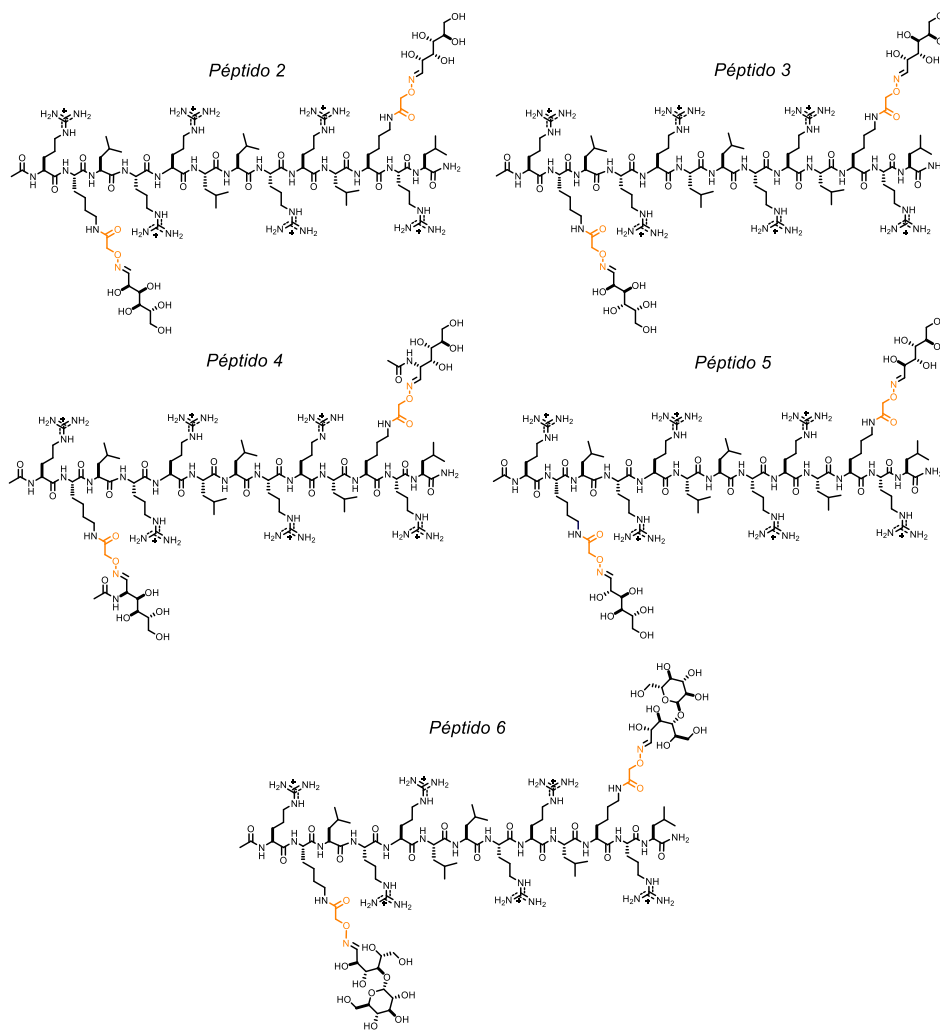


Figura 23. Estructura lineal de los péptidos acoplados a los diferentes sacáridos comerciales de la **figura 22**. Péptido 2 (sacárido A), péptido 3 (sacárido B), péptido 4 (sacárido C), péptido 5 (sacárido D) y péptido 6 (disacárido E).

La formación de una oxima con el azúcar reductor ocasiona la pérdida de su forma de hemiacetal (cerrada) que es la que reconoce la proteína. Por lo tanto y para poder garantizar la integridad estructural del ligando que reconoce a la proteína, decidimos incorporar un aldehído a la *D*-manosa. Por lo tanto, se procedió a la síntesis de un derivado de la *D*-manosa (α – formilmetil – manopiranosido) que proporciona una serie de ventajas: permite el acoplamiento del monosacárido al péptido manteniendo su estructura cíclica así como una mayor simplicidad del método de síntesis. Este método permite una reducción del tiempo de reacción y que la reacción ocurra de manera cuantitativa a temperatura ambiente. Además al permanecer el azúcar cerrado en forma de piranosido, el reconocimiento por parte de la lectina mantiene la especificidad original del azúcar. Este derivado de *D*-manosa ha sido preparado de acuerdo con el método descrito y una vez purificadas las señales espectroscópicas coinciden con los datos publicados²².

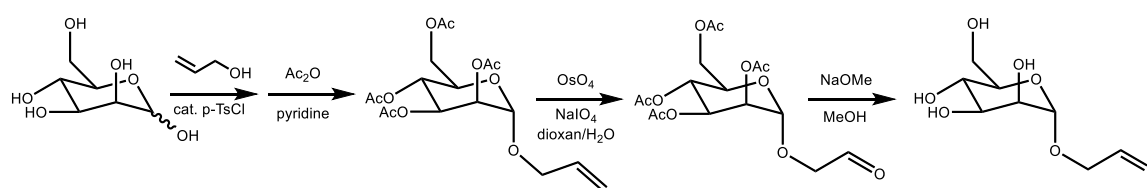


Figura 24. Reacciones de síntesis para la obtención del derivado a partir de *D*-manosa. Este derivado fue preparado por Marisa Juanes en el grupo de J. R Granja y Javier Montenegro.

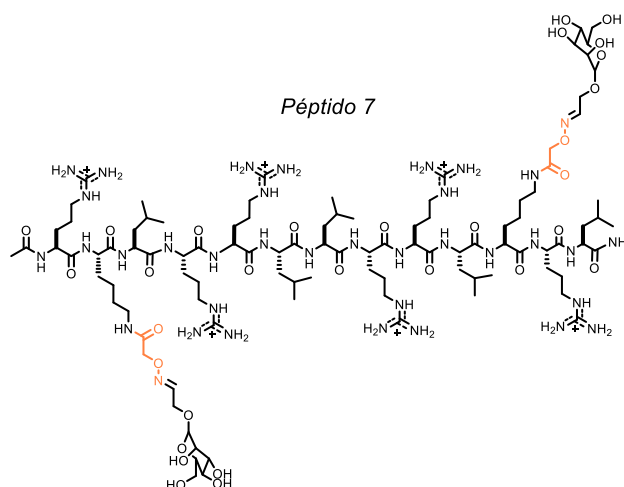


Figura 25. Estructura lineal del péptido con el derivado de *D*-manosa acoplado.

Disponiendo del aldehído de la *D*-manosa procedimos al anclaje sobre el péptido. Una vez purificado por *HPLC* de fase reversa se identificó el producto final mediante masas y ¹H-RMN (detalles en parte experimental). Algunas señales significativas del espectro de resonancia son: el multiplete entre 0.90 – 0.62 ppm que integra por 30H y que corresponde con los –CH₃ de las cadenas laterales de las leucinas. El singlete a 1.92 ppm que integra por 3H correspondiente a los –CH₃ del acetilo. El multiplete situado a 4.16 ppm que integra por 13H corresponde a los –CH en alfa. El multiplete que integra por 12H entre 3.90 – 3.45 ppm corresponde con los azúcares.

²²Wenjun Yao, Yan Jiao, Juan Luo, Mingzhu Du, Li Zong, International Journal of Biological Macromolecules, **2012**, 50, 821

O=C(O)c1ccc2c(c1)O(=O)c3cc4c2Oc5ccc(O)cc5Oc6ccc(O)cc64

The reaction scheme illustrates the synthesis of a dendritic dendronized poly(amide amine) dendronized with a fluorescein derivative. The process begins with a Rink Amide resin (FmocHN-Resin) and proceeds through several steps:

- 1. 20% piperidine/DMF**: Deprotection of the Fmoc group from the resin.
- 2. Fmoc-L-Leu-OH, HBTU, DIEA, DMF**: Coupling of Fmoc-L-Leu-OH to the resin.
- 1. 20% piperidine/DMF**: Deprotection of the Fmoc group from the resin.
- 2. Ácido 6-(Fmoc-amino) hexanoico, HBTU, DIEA, DMF**: Coupling of 6-(Fmoc-amino)hexanoic acid to the resin.
- 1. DCM (65%), HFIP (20%), TFE (10%), TIS (5%)**: Deprotection of the Fmoc group from the resin.
- 2. (boc-aminoxy)acetic acid, HATU, DIEA**: Coupling of (boc-aminoxy)acetic acid to the resin.
- 1. 20% piperidine/DMF**: Deprotection of the Fmoc group from the resin.
- 2. Carboxyfluoresceína HBTU, DIEA, DMF**: Coupling of Carboxyfluorescein to the resin.
- 1. TFA (90%), H₂O (2.5%), TIS (2.5%), DCM (5%)**: Deprotection of the Boc group from the resin.

The final product is a dendritic dendronized poly(amide amine) dendronized with a fluorescein derivative, featuring a complex dendritic structure with multiple amine and amide groups, and a fluorescein moiety at the end of the chain.

27

Una vez completado con éxito el acoplamiento del fluoróforo sobre la resina, se procederá a la purificación del péptido y el anclaje del derivado de la *D*-manosa descrito anteriormente.

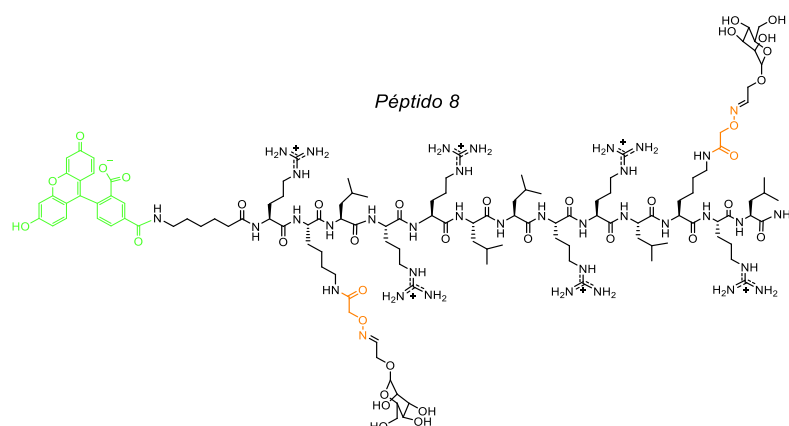


Figura 28. Estructura final del péptido con fluoróforo con el derivado de *D*-manosa acoplado.

Una vez acoplado el azúcar y después de purificación por *HPLC* de fase reversa se identificó el producto final mediante masas y ^1H -RMN. Algunas señales significativas del espectro de resonancia son: el multiplete entre 0.87 – 0.66 *ppm* que integra por 30H y que corresponde con los $-\text{CH}_3$ de las cadenas laterales de las leucinas. El multiplete situado entre 4.24 – 4.01 *ppm* que integra por 13H corresponde a los $-\text{CH}$ en alfa. La señal multiplete entre 3.87 – 3.31 *ppm* que integra por 12H corresponde con los hidrógenos de los azúcares. La señales situadas entre 8.21 y 6.75 *ppm* corresponde con los hidrógenos del fluoróforo.

4.4 Determinación estructural mediante dicroísmo circular

Tal y como se mencionó, se pretende que el péptido adquiera una conformación de hélice α . Para estudiar la estructura del péptido se llevarán a cabo medidas de dicroísmo circular a una concentración 200mM del mismo, a diferentes temperaturas (10 – 60 °C) y en dos tipos de disolvente: uno hidrofóbico (*TFE*) y otro hidrofílico (*buffer HKR*), con el objetivo de simular la membrana celular (hidrofóbica) y el exterior e interior celular (hidrofílico).

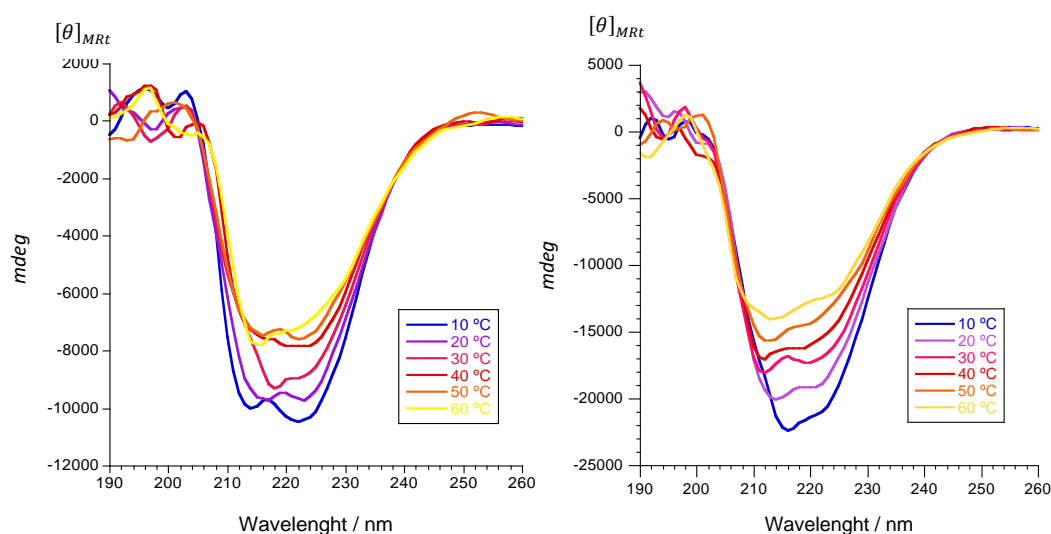


Figura 29. a) Dicroísmo circular del péptido 8 en buffer HKR b) dicroísmo circular del péptido 8 en TFE.

Las curvas obtenidas se representan en **figura 29** en las que se pueden apreciar los dos mínimos característicos de una hélice α : a 208 y 222 nm aproximadamente. En las gráficas también se observa que a medida que aumenta la temperatura la helicidad disminuye. Este resultado concuerda en términos bibliográficos, ya que el calor es uno de los factores de desnaturalización de las proteínas provocando así la pérdida de helicoidicidad.

Para conocer el grado de helicoidicidad del péptido se utiliza la **fórmula 1** y el valor del mínimo de la banda a 222 nm (banda característica de la helicoidicidad del péptido). A una temperatura de 20 °C el porcentaje de helicoidicidad en agua es 25,3% y en TFE es 58.3%.

4.5 Estudios de internalización en células

Una vez preparados los péptidos conteniendo residuos de hidroxilamina, y habiendo estudiando la viabilidad para la incorporación de azúcares reductores y otros aldehídos, decidimos estudiar su internalización celular tanto en ausencia como en presencia de la proteína reconocida específicamente por los ligandos del péptido. Por ello decidimos estudiar de forma particular el péptido 8 que contiene un fluoróforo y un azúcar en forma de piranósido.

Para evaluar la capacidad penetrante del péptido diseñado en ausencia de proteína, se utilizan estudios de microscopía de fluorescencia en células *HeLa*. Para ello su comportamiento se compara con el péptido de octarginina marcada con carboxifluoresceína, un péptido penetrante (CPP) típico y conocido. Siguiendo el protocolo de internalización celular explicado en el procedimiento experimental, se prepararon disoluciones de una concentración 3 μ M de cada uno de los péptidos en buffer HKR (5mM de HEPES, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 2,05 mM MgCl₂. 6H₂O, 1,8 mM CaCl₂. 2H₂O) y se incubó en las células *HeLa*.

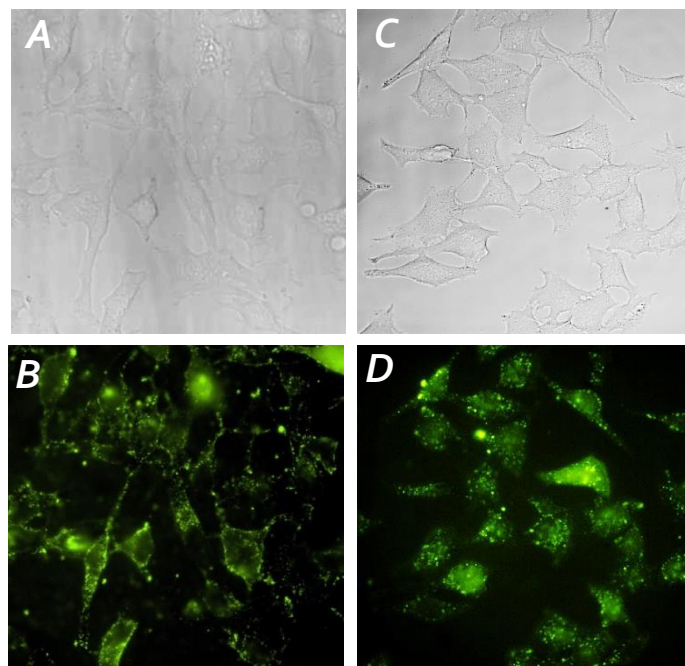


Figura 30. Internalización del péptido 8 y Arg8. (A) DIC del péptido 8 (B) internalización del péptido 8 seguida mediante microscopía de fluorescencia (C) DIC de la Arg8 (D) Internalización de la Arg8 seguida mediante microscopía de fluorescencia.

Como se puede observar en la **figura 30** el péptido diseñado se internaliza en las células con aproximadamente la misma eficacia que la octarginina (CPP de referencia).

Una vez confirmada la capacidad penetrante del péptido diseñado, se procede al estudio del transporte de la proteína de interés que se quiere internalizar, en este caso la **Concanavalina A**, una de las lectinas más utilizadas en biología celular. Dicha proteína es homotetramérica, presentando cuatro sitios de unión, una por monómero. Para seguir su actividad, es necesario que esté marcada con un fluoróforo, en este caso el conjugado 647 de Alexa Flúor. Exhibe una emisión de fluorescencia en la región rojo-lejano del espectro visible ($\lambda_{ex} = 650\text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 668\text{ nm}$). Para el reconocimiento del ligando manosa es necesaria la presencia de cationes divalentes, normalmente Ca^{+2} y Mg^{+2} , motivo por el cual se seleccionó el buffer HKR.

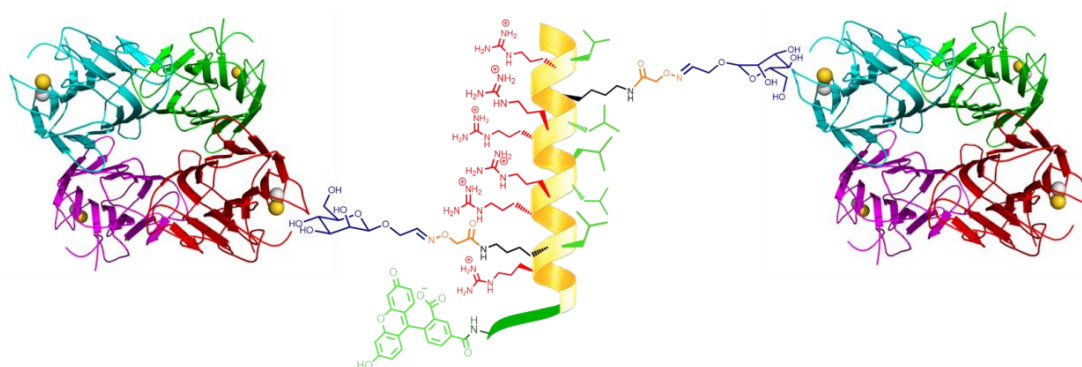


Figura 31. Configuración tridimensional en hélice α del péptido 8 junto con la Concanavalina A

Igual que en el apartado anterior, siguiendo el protocolo explicado en la sección experimental se emplearán células *HeLa*, una concentración $3\mu\text{M}$ del péptido y 30 nM de Concanavalina A (1: 1000). El péptido y la proteína se incuban previamente durante 2 min en buffer *HKR* a temperatura ambiente y posteriormente se incuban con las células durante 30 min . Finalmente las células se lavan con buffer *HKR* y se observan al microscopio de célula viva. En la **figura 32** se observa que el péptido fue capaz de transportar la proteína al interior celular y colocalizar con ella como se aprecia en la imagen que fusiona los dos canales: péptido (verde, **figura 32B**) y proteína (rojo, **figura 32C**) dando lugar a una coloración amarilla (**figura 32D**).

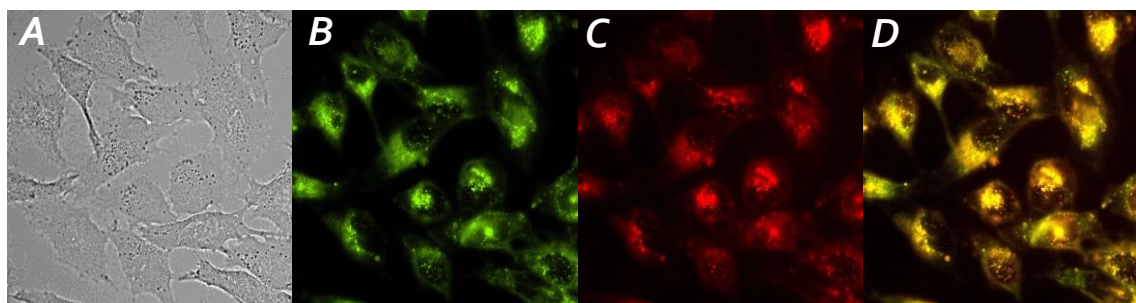


Figura 32. Internalización de la Concanavalina A. (A) DIC (B) internalización del péptido 8 seguida mediante microscopía de fluorescencia (C) internalización de la Concanavalina A seguida mediante microscopía de fluorescencia (D) Colocalización del péptido 8 y la proteína de interés.

5. Procedimiento experimental

5.1 Descripción general de reactivos e instrumentos

El Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH, 5(6)-Carboxifluoresceína, TFE, TIS, HFPI, Anhídrido acético, Concanavalin A, from Canavalia ensiformis (Jack bean), Ácido 6-(Fmoc-amino) hexanoico, Piperidina fueron adquiridos a Sigma Aldrich. La Concanavalina A, Alexa Fluor 647 Conjugate fue proporcionado por Thermo Fisher Scientific. El HATU fue adquirido a Glenham Life Sciences. El éter se adquirió en Panreac. El Fmoc-L-Lys(Mtt)-OH, el HBTU, resina Fmoc-Rink Amida fueron conseguidas a Iris. La DIEA fue adquirida a Fluka-Sigma Aldrich. El (Boc-aminooxy)acetic Acid fueron proporcionadas por TCI Europe. El DCM-HPLC, TFA, DMF para síntesis de péptidos fueron adquiridos a Fischer Scientific. Todos los disolventes utilizados son de calidad de síntesis o de HPLC, utilizándolos sin purificación adicional. Para la realización de la síntesis en fase sólida se utilizó la DMF de grado de síntesis de péptidos. Los azúcares (D-glucosa, D-manosa, D-manosa, N-acetilglucosamina y Maltosa) fueron adquiridos a Sigma Aldrich y Carbosynth.

La síntesis en fase sólida se realizó manualmente. La purificación por HPLC se llevó a cabo en un cromatógrafo AGILENT 1100. Se utilizó como relleno de columna el Nucleosil 120-10-C-18 para las purificaciones en una columna preparativa. Para la fase reversa se emplearon las mezclas de acetonitrilo con 0,1 % TFA (disolvente B) y agua con un 0,1 % TFA (disolvente A). En la técnica HPLC – MS se empleó un cromatógrafo AGILENT 1100 serie en tándem con un espectrómetro de masas AGILENT G1956A. Para la caracterización de los compuestos se empleó la técnica ESI de espectroscopía de ionización por electrospray (Bruker Microtof ESI-TOF), fue realizada en un instrumento Finnigan MAT SSQ 7000 y en ESI API 150EX y la información fue recogida como masa por carga (m/z) frente intensidad (%).

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian Mercury-300 MHz y Varian Inova 500 MHz. El disolvente utilizado fue D₂O. Los desplazamientos químicos se dan en unidades de partes por millón (ppm, δ). La asignación de señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón, ¹H-RMN, se designaron como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuádruplete (q); las demás señales fueron designadas como multiplete (m).

La medidas de dicroísmo circular (CD) fueron realizadas en un espectrómetro Jasco J-1100 CD equipado con un controlador de temperatura.

Los experimentos de fluorescencia y las imágenes fueron adquiridos con una cámara digital ANDOR ZYLA 4.2 construida en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-E.

5.2 Síntesis

5.2.1 Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)

A) Preparación de la resina: La síntesis se llevará a cabo utilizando la resina Rink Amida, en primer lugar se pesan 140.8 mg de resina (0.1 mmol; carga = 0.71 mmol/g resina) en un cartucho de síntesis de fase sólida, situado en un matraz de fondo redondo de dos bocas, se añade DMF y se burbujea con un flujo constante de Ar durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se filtra, obteniéndose una resina hinchada y lista para realizar los acoplamientos.

B) Ruptura del grupo protector temporal (Fmoc): Se añade sobre la resina una disolución de piperidina al 20% en DMF bajo flujo de Ar durante 20 minutos aproximadamente para desproteger el grupo Fmoc de la resina. Una vez finalizado este tiempo, se filtra a vacío y se realizan tres lavados con 5 ml de DMF de 2 minutos cada uno.

C) Acoplamiento de los aminoácidos: Para realizar el primer acoplamiento, se disuelven 152 mg de HBTU (4 eq, 379,24 g/mol) y la cantidad correspondiente de aminoácido (4 eq) en 1 ml de DMF, a continuación se añaden 0,65 ml de DIEA (0.195 M en DMF) a la disolución anterior. La mezcla resultante se añade al cartucho y se deja burbujear con Ar durante 15 minutos aproximadamente. Transcurrido este tiempo, se filtra y se realizan nuevamente tres lavados con 5 ml de DMF de 2 minutos cada uno.

Una vez que la resina está filtrada y lavada, para comprobar que el acoplamiento ha transcurrido cuantitativamente se realiza el test TNBS, para ello se retira una pequeña cantidad de resina y se introduce en un eppendorf a la cual se le añaden los reactivos del test, si se observa una coloración blanca el acoplamiento ha sido efectivo, mientras que por lo contrario, si se observa un color rojizo el acoplamiento no ha tenido lugar en su totalidad y por tanto, sería necesario realizar un *capping*. Para ello se prepararía una disolución de 1 ml de 2,6-lutidina y 1 ml de anhídrido acético, y se añadiría sobre la resina siguiendo el procedimiento como si se tratara de un acoplamiento habitual.

El resto de aminoácidos se acoplan siguiendo el mismo procedimiento al descrito anteriormente hasta la obtención del péptido final deseado.

D) Terminación:

- Acetilación: Una vez finalizada la síntesis del péptido, se acetila el grupo amino del último aminoácido acoplado, para ello se utiliza una disolución (1:1) de anhídrido acético y 2, 6-lutidina bajo flujo de Ar durante 30 minutos; una vez transcurrido ese tiempo se realizan tres lavados con DMF y otros tres con DCM-HPLC.
- Acoplamiento del espaciador: En caso de añadir al extremo de los péptidos un fluoróforo, se realiza el acoplamiento del aminoácido 6-(Fmoc-amino) caproic acid. Para ello se desprotege el Fmoc del último aminoácido acoplado y se añade el espaciador siguiendo el procedimiento C.

E) Ruptura del grupo Mtt de las Lys: se prepara una disolución de 650 μl de DCM-HPLC, 200 μl de HFIP, 50 μl de TIS y 100 μl de TFE (4 ml). Debido a la presencia de más de un grupo Mtt, se realiza la desprotección dos veces bajo agitación, utilizando dos mililitros de la disolución anterior, durante dos horas de cada una de las veces. Entre cada proceso se realizan varios lavados con DCM-HPLC.

F) Acoplamiento del grupo reactivo [(Boc-aminooxy)acetic Acid]: Una vez desprotegido el grupo Mtt, se hincha la resina utilizando DMF y se procede al acoplamiento de las hidroxilaminas. Para ello se emplea (Boc – aminooxy)acetic Acid (2.5 eq por Lys), HATU (2.5 eq por Lys), y DIEA (4 eq por Lys). Se pesan las cantidades necesarias de HATU y de (Boc – aminooxy)acetic Acid, y se diluyen en 0.5 mL de DMF cada uno, a continuación se añaden ambas disoluciones a la resina y por último, se adiciona lentamente gota a gota y bajo flujo de Ar la cantidad correspondiente de DIEA, observándose como la disolución en el cartucho adquiere una coloración amarillo-verdoso. Al finalizar, se lava la resina tres veces con DMF y con DCM-HPLC.

G) Acoplamiento de la carboxifluoresceína: Para aquellos péptidos terminados con el aminoácido espaciador, se procede al acoplamiento del fluoróforo. Para ello la reacción se lleva a cabo sobre la resina como si se tratara de un acoplamiento de un aminoácido. En primer lugar se añade piperidina (20% en DMF) bajo flujo de Ar durante 20 min aproximadamente para desproteger el grupo Fmoc del ligando espaciador. Transcurrido este tiempo se realizan tres lavados con DMF de dos minutos cada uno. Para realizar el acoplamiento, se disuelven 76 mg de HBTU (2 eq) y 75.3 mg de fluoróforo (2 eq) en 1 mL de DMF, y se añaden 0.33 mL de DIEA (0.195 M) a la disolución anterior. La mezcla resultante se añade al cartucho y se deja burbujear con Ar durante 30 minutos aproximadamente. Transcurrido este tiempo, se realizan nuevamente tres lavados con DMF de dos minutos cada uno.

Para comprobar que cada uno de los pasos ha tenido lugar correctamente, se realizan análisis de HPLC-MS a pequeñas porciones del péptido rompiéndolo de la resina.

H) Rotura del péptido de la resina: Sobre la resina se añaden 2 ml de una disolución formada por TFA: DCM: TIS: H_2O (90:5:2.5:2.5) y se agita mecánicamente durante aproximadamente dos horas. Transcurrido este tiempo, se filtra y se lava con TFA. El filtrado se concentra burbujear con Ar en el matraz que lo contiene para eliminar la mayor cantidad de TFA posible. A continuación dichos filtrados se añadieron lentamente sobre Et_2O (25 ml) para la precipitación del péptido, se centrifuga unos minutos y se retira el disolvente. Una vez aislado el precipitado se redisuelve en H_2O miliQ, se purifica y se liofiliza.

5.2.2 Acoplamiento de diferentes sacáridos al péptido

Una vez purificado el péptido, se prepara una disolución 5 mM molar del mismo en H_2O miliQ para el posterior anclaje de los diferentes sacáridos.

A) Azúcares comerciales: La *D*-glucosa, *D*-galactosa, *D*-manosa, *N*-acetilglucosamina (monosacáridos) y maltosa (disacárido) se acoplaron a las hidroxilaminas presentes en la cadena peptídica. Para dicho acoplamiento se preparan disoluciones 120 mM H_2O miliQ de cada uno de los sacáridos y se hace reaccionar con la disolución anterior del péptido a 60°C durante dos horas.

B) Derivado de la *D*-manosa: Se prepara una disolución 120 mM del azúcar (2 eq por cola) y se añade sobre la disolución del péptido anterior. En este caso la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 15 min.

5.3 Caracterización de los compuestos

Péptido 1. Se sintetiza siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para péptidos. Se purifica mediante HPLC en fase reversa siguiendo el método: [Nucleosil 120-10-C-18, H_2O con un 0,1% *TFA* (disolvente A) y CH_3CN con 0,1% *TFA* (disolvente B) 95:5 → 25:75 (0 → 10 min)]. **MS (ESI-TOF, H_2O):** 1373.03 (100, $[M + 4TFA + 2H]^{+2}$); 877,89 (20, $[M + 3TFA + 3H]^{+3}$)

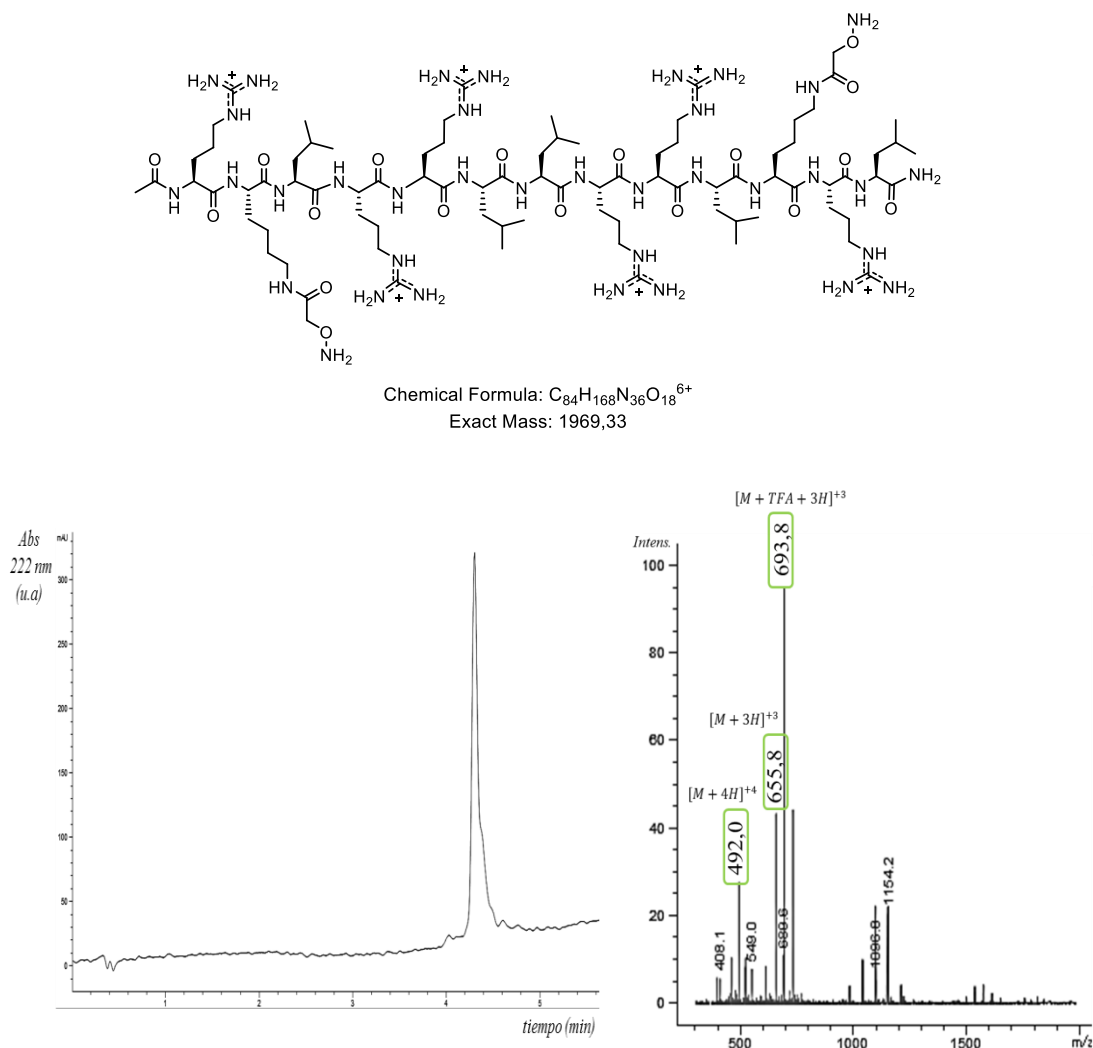


Figura 33. Espectro HPLC y MS del péptido 1

Péptido 2. Se sintetiza siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para péptidos. Se purifica mediante HPLC en fase reversa siguiendo el método: [Nucleosil 120-10-C-18, H_2O con un 0,1% TFA (disolvente A) y CH_3CN con 0,1% TFA (disolvente B) 95:5 \rightarrow 25:75 (0 \rightarrow 10 min)]. **MS (ESI-TOF, H_2O):** 1373.03 (100, $[M + 4TFA + 2H]^{+2}$); 877,89 (20, $[M + 3TFA + 3H]^{+3}$)

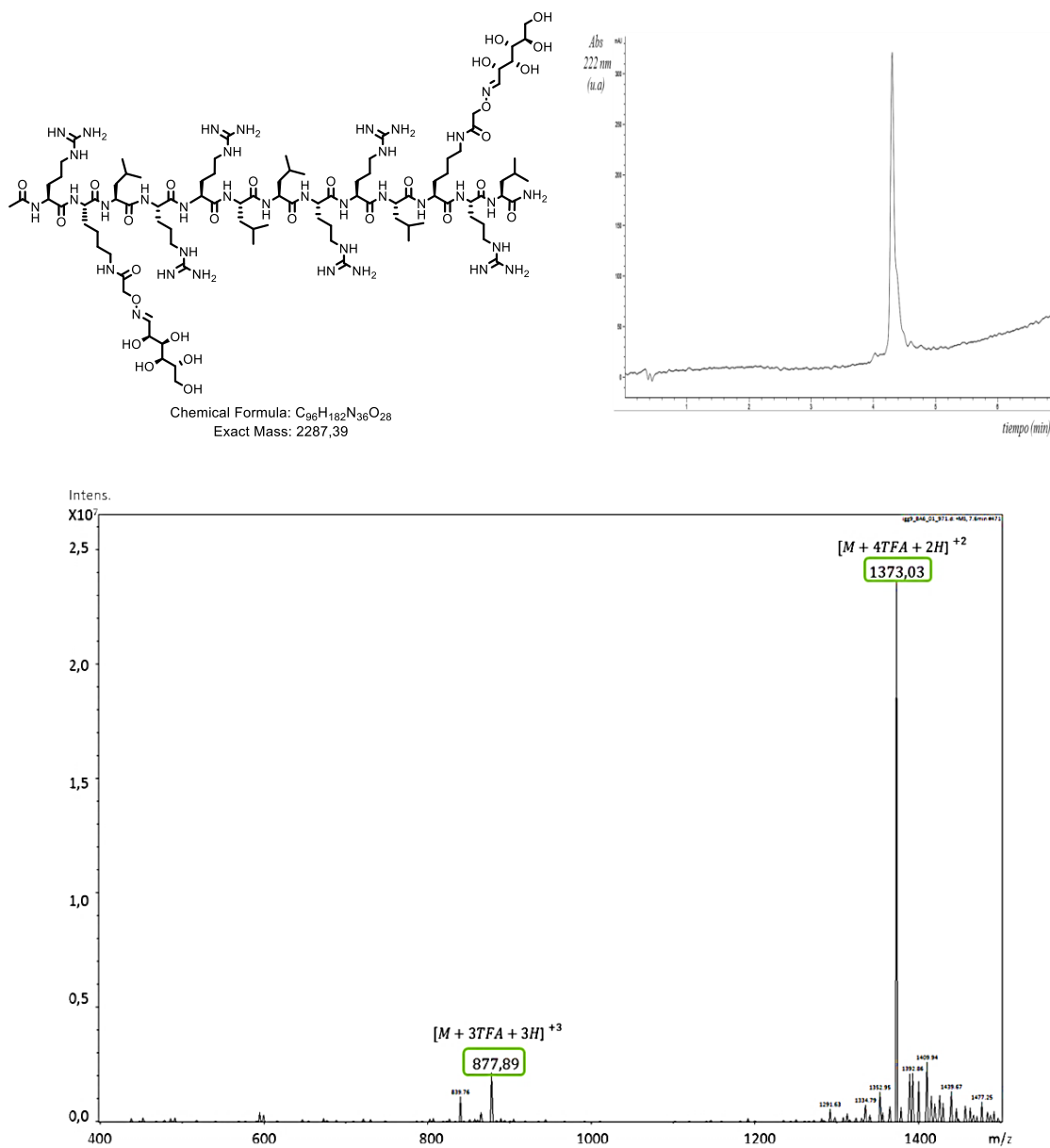


Figura 34. Espectro de HPLC y MS del péptido 2

Péptido 3. Se sintetiza siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para péptidos. Se purifica mediante HPLC en fase reversa siguiendo el método: [Nucleosil 120-10-C-18, H_2O con un 0,1% TFA (disolvente A) y CH_3CN con 0,1% TFA (disolvente B) 95:5 \rightarrow 25:75 (0 \rightarrow 10 min)]. **MS (ESI-TOF, H_2O):** 877,89 (100, $[M + 3TFA + 3H]^+3$); 839,92 (20, $[M + 2TFA + 3H]^+3$); 630,16 (80, $[M + 2TFA + 4H]^+4$); 458,71 (40, $[M + 5H]^+5$)

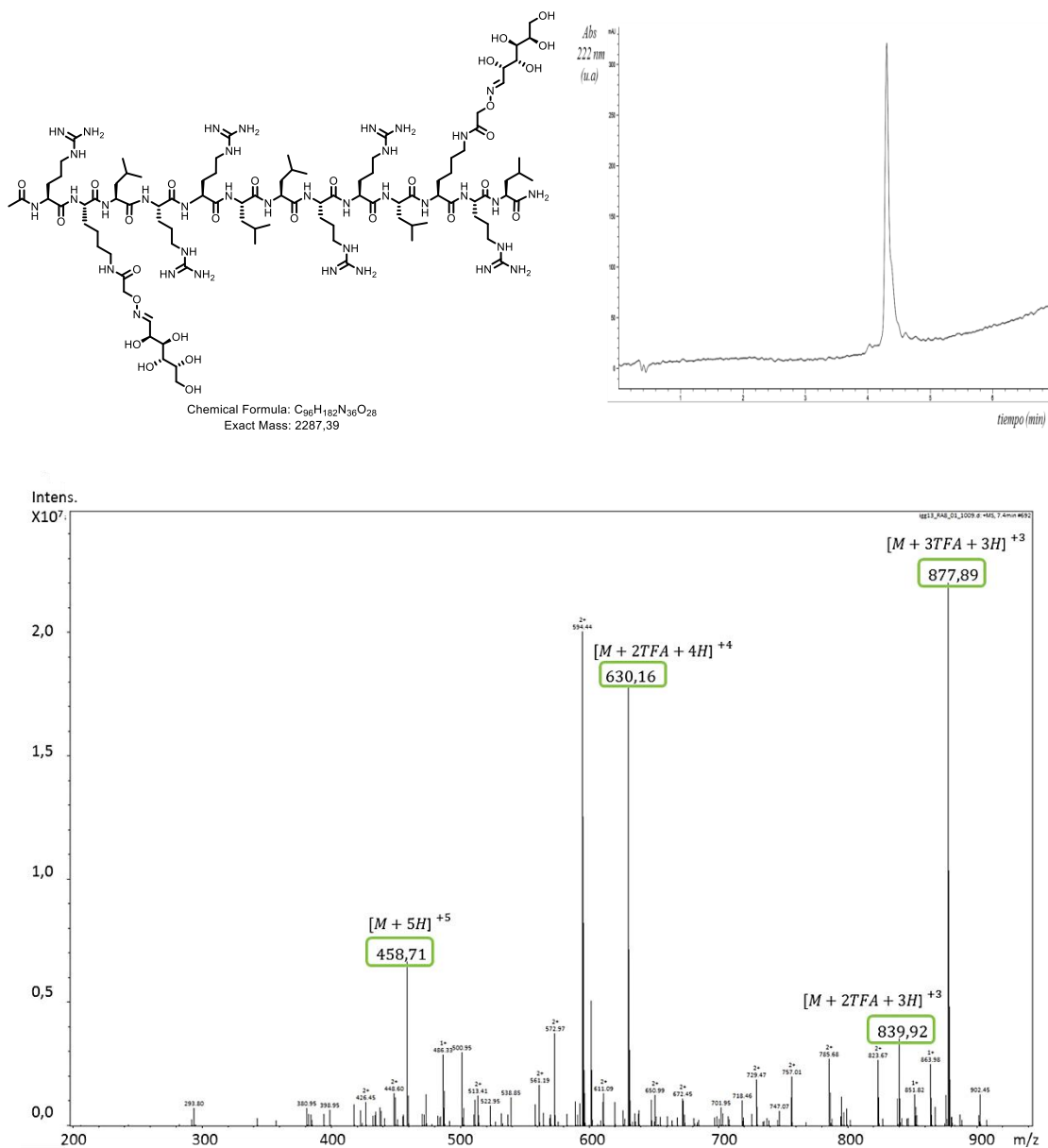


Figura 35. Espectro HPLC y MS del péptido 3

Péptido 4. Se sintetiza siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para péptidos. Se purifica mediante HPLC en fase reversa siguiendo el método: [Nucleosil 120-10-C-18, H_2O con un 0,1% TFA (disolvente A) y CH_3CN con 0,1% TFA (disolvente B) 95:5 \rightarrow 25:75 (0 \rightarrow 10 min)]. **MS (ESI-TOF, H_2O):** 1414.21 (100, $[M + 4TFA + 2H]^{+2}$); 905.18 (30, $[M + 3TFA + 3H]^{+3}$).

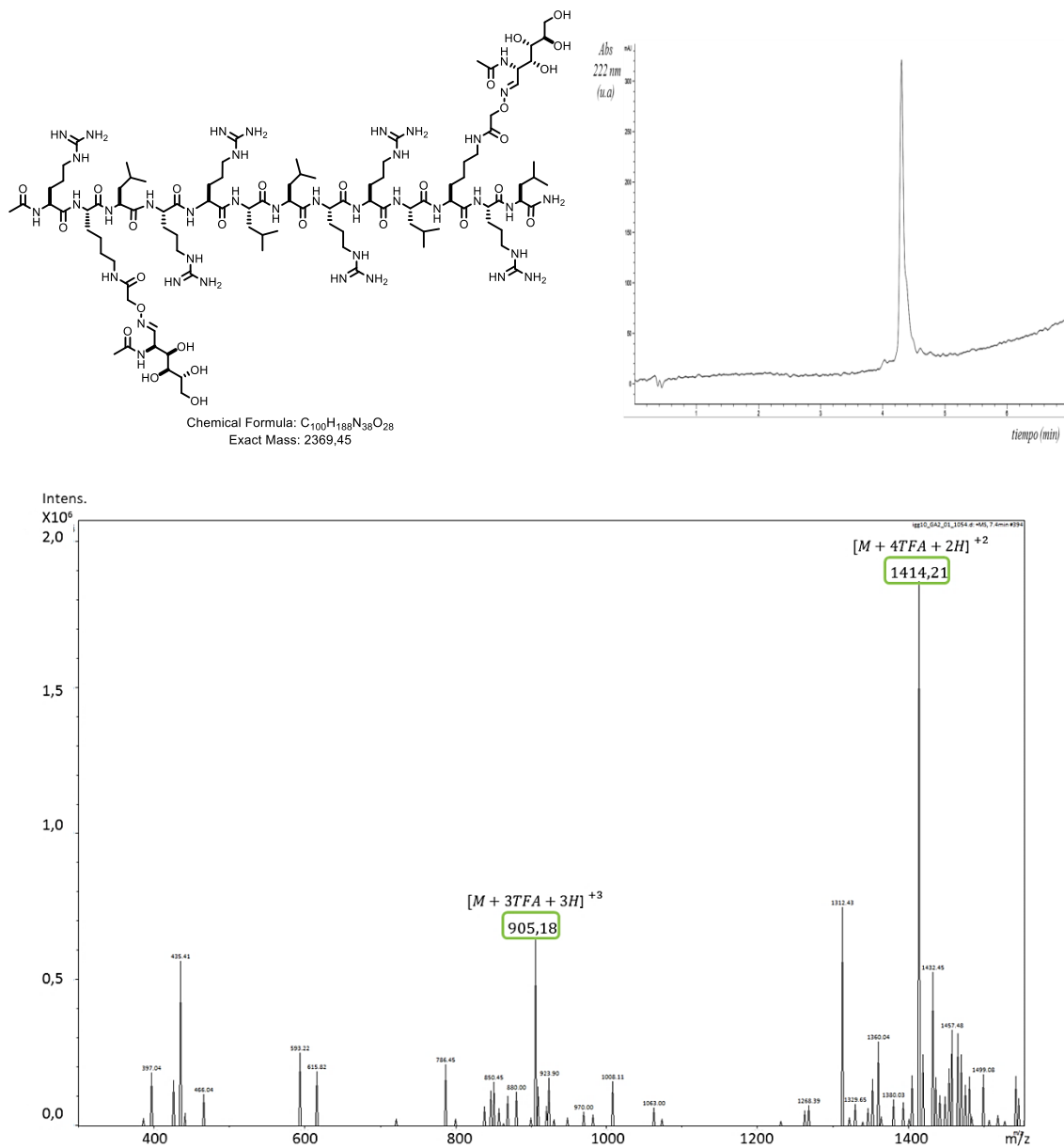


Figura 36. Espectro HPLC y MS del péptido 4

Péptido 5. Se sintetiza siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para péptidos. Se purifica mediante HPLC en fase reversa siguiendo el método: [Nucleosil 120-10-C-18, H_2O con un 0,1% TFA (disolvente A) y CH_3CN con 0,1% TFA (disolvente B) 95:5 \rightarrow 25:75 (0 \rightarrow 10 min)]. **MS (ESI-TOF, H_2O):** 1373.03 (100, $[M + 4TFA + 2H]^{+2}$); 877.88 (20, $[M + 3TFA + 3H]^{+3}$).

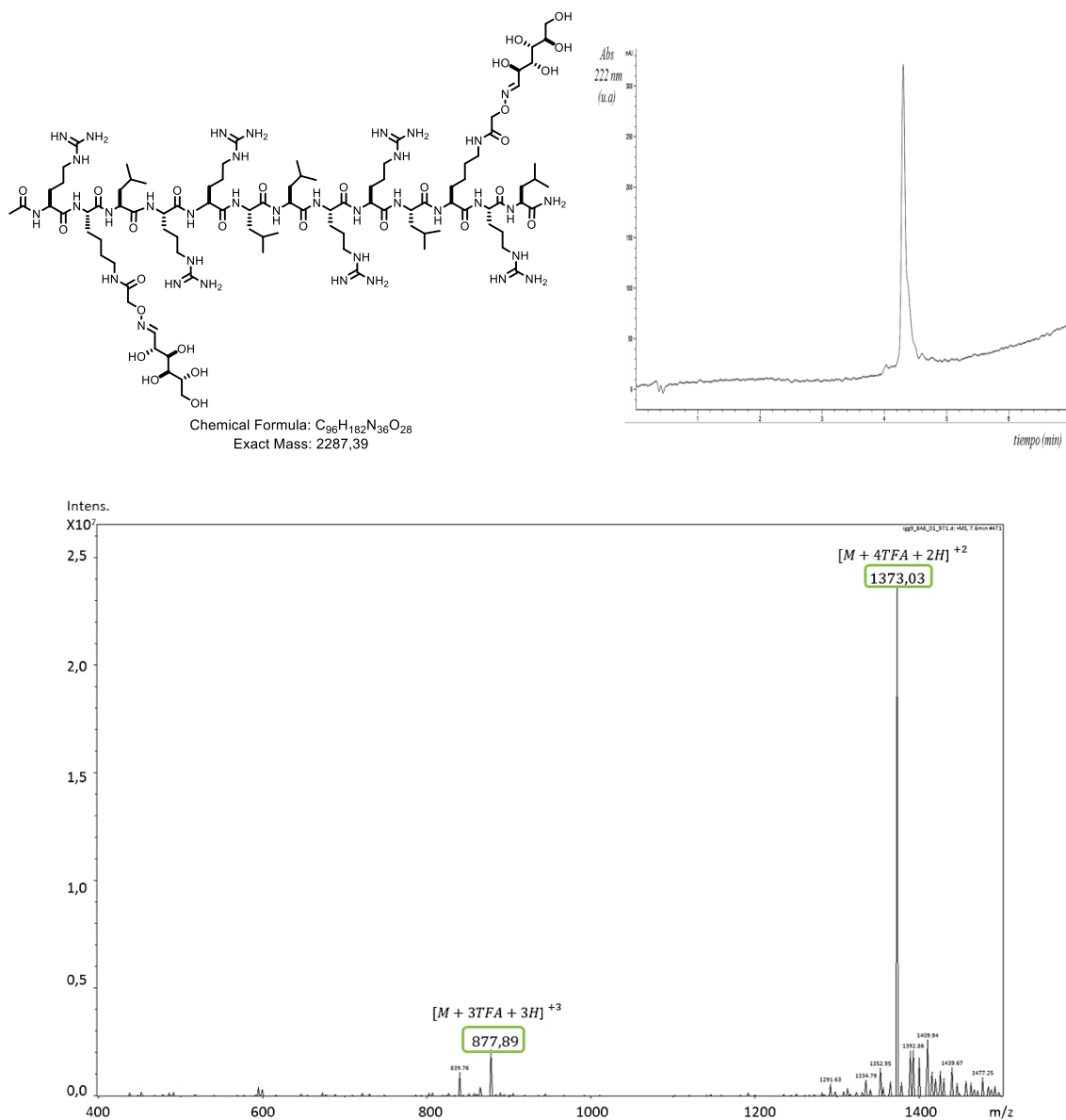


Figura 37. Espectro HPLC y MS del péptido 5

Péptido 6. Se sintetiza siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para péptidos. Se purifica mediante HPLC en fase reversa siguiendo el método: [Nucleosil 120-10-C-18, H_2O con un 0,1% TFA (disolvente A) y CH_3CN con 0,1% TFA (disolvente B) 95:5 \rightarrow 25:75 (0 \rightarrow 10 min)]. **MS (ESI-TOF, H_2O):** 1535.16 (100, $[M + 4TFA + 2H]^{+2}$); 985.43 (20, $[M + 3TFA + 3H]^{+3}$).

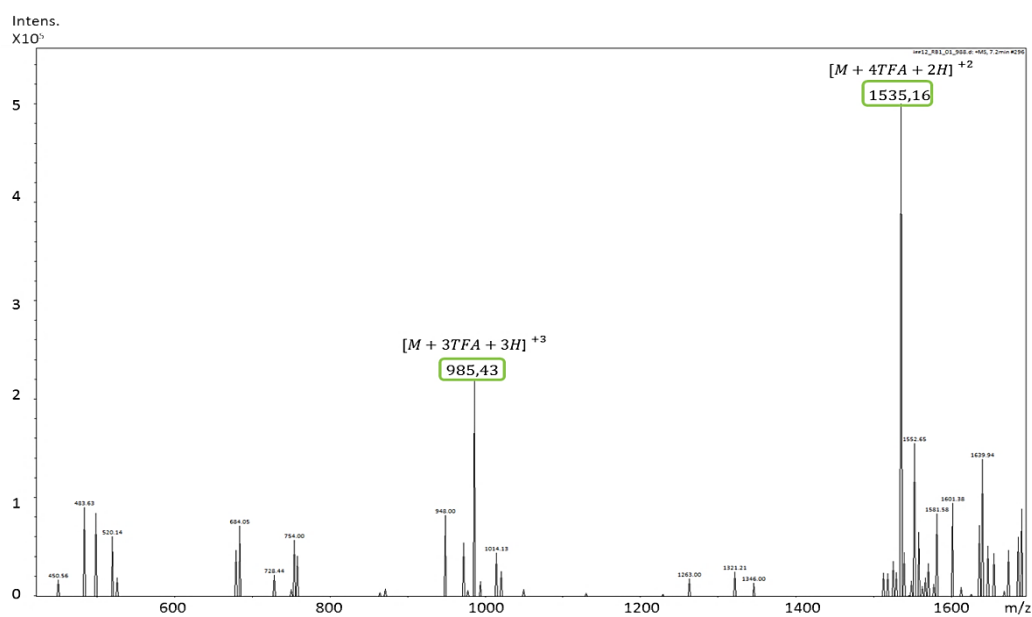
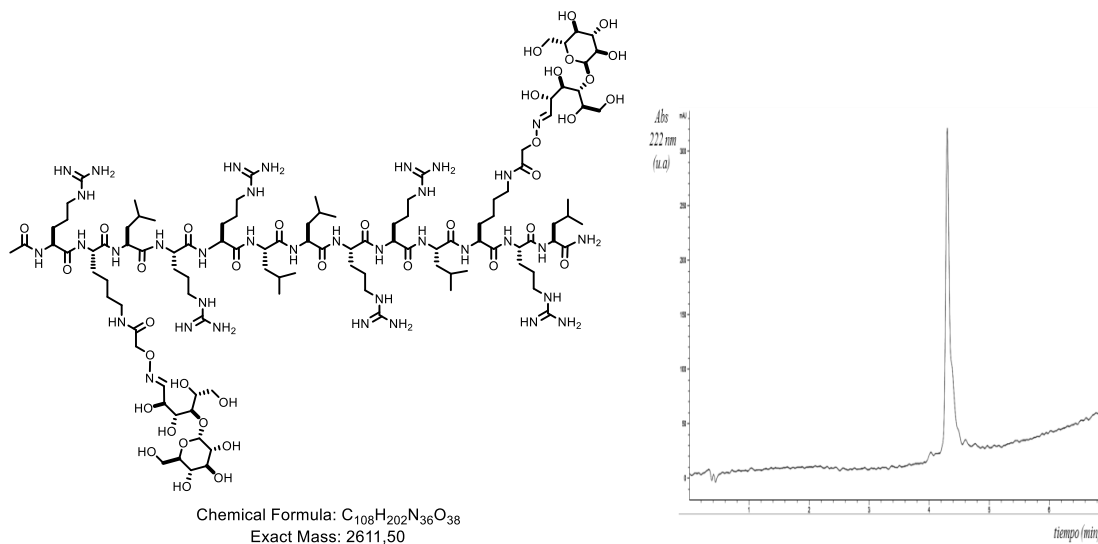
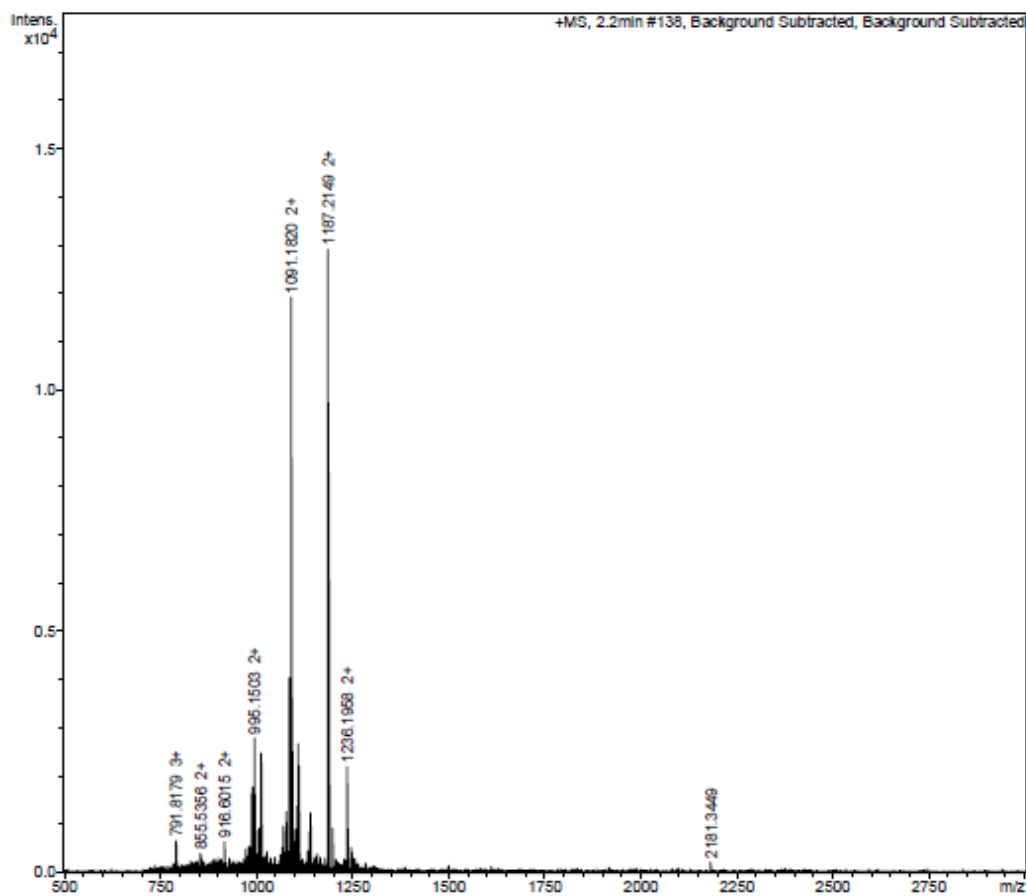
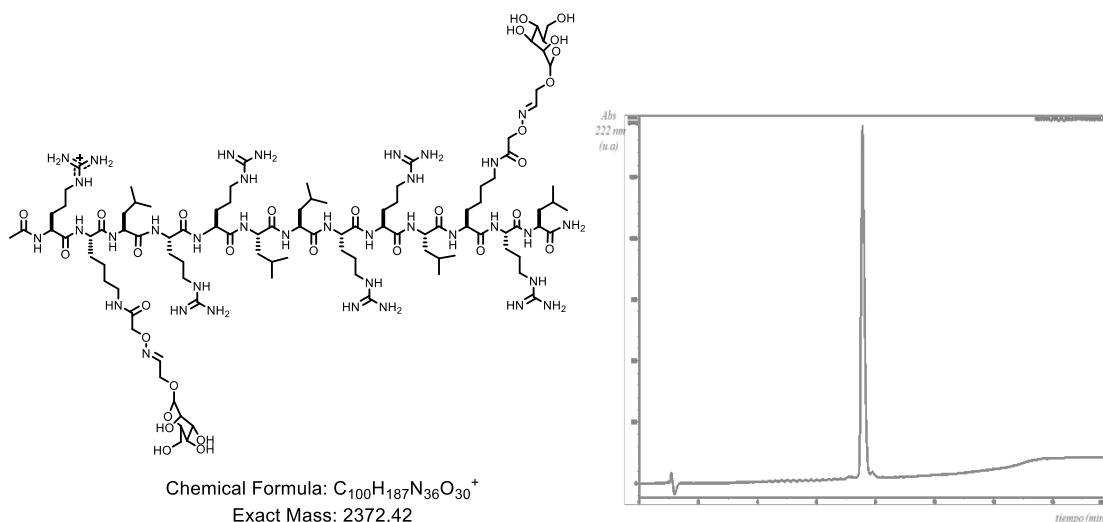


Figura 38. Espectro HPLC y MS del péptido 6

Péptido 7. Se sintetiza siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para péptidos. Se purifica mediante HPLC en fase reversa siguiendo el método: [Nucleosil 120-10-C-18, H_2O con un 0,1% *TFA* (disolvente A) y CH_3CN con 0,1% *TFA* (disolvente B) 95:5 \rightarrow 25:75 (0 \rightarrow 10 min)]. T.r= 7,8 min; se obtuvieron 33 mg (15%). 1H NMR (D_2O , 300 MHz) δ 7.62 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.02 (t, J = 3.8 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.75 – 4.67 (m, 4H), 4.48 – 4.37 (m, 4H), 4.16 (d, J = 11.6 Hz, 13H), 3.90 – 3.45 (m, 12H), 3.17 – 2.98 (m, 16H), 1.92 (s, 3H), 1.78 – 1.15 (m, J = 65.3 Hz, 51H), 0.90 – 0.62 (m, J = 15.7 Hz, 30H). **MS (ESI-FIA-TOF, H_2O):** 1187.2149 (100, $[M + 2H]^{+2}$); 791.8179 (20, $[M + 3H]^{+3}$).



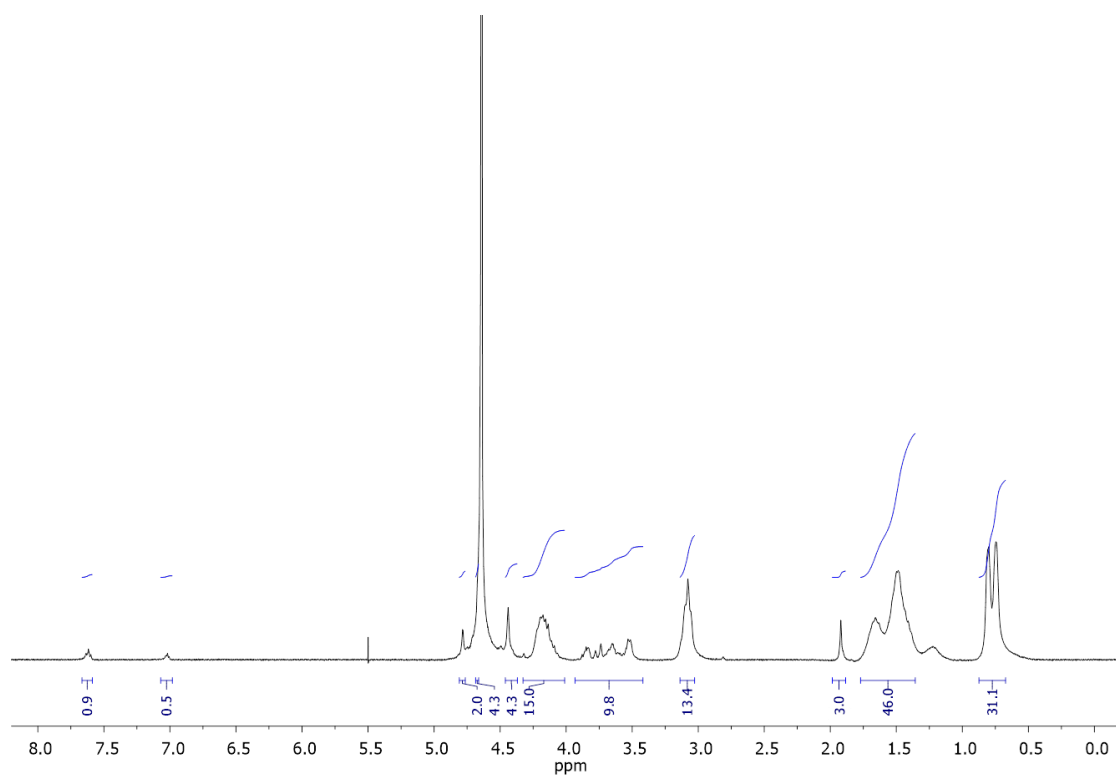
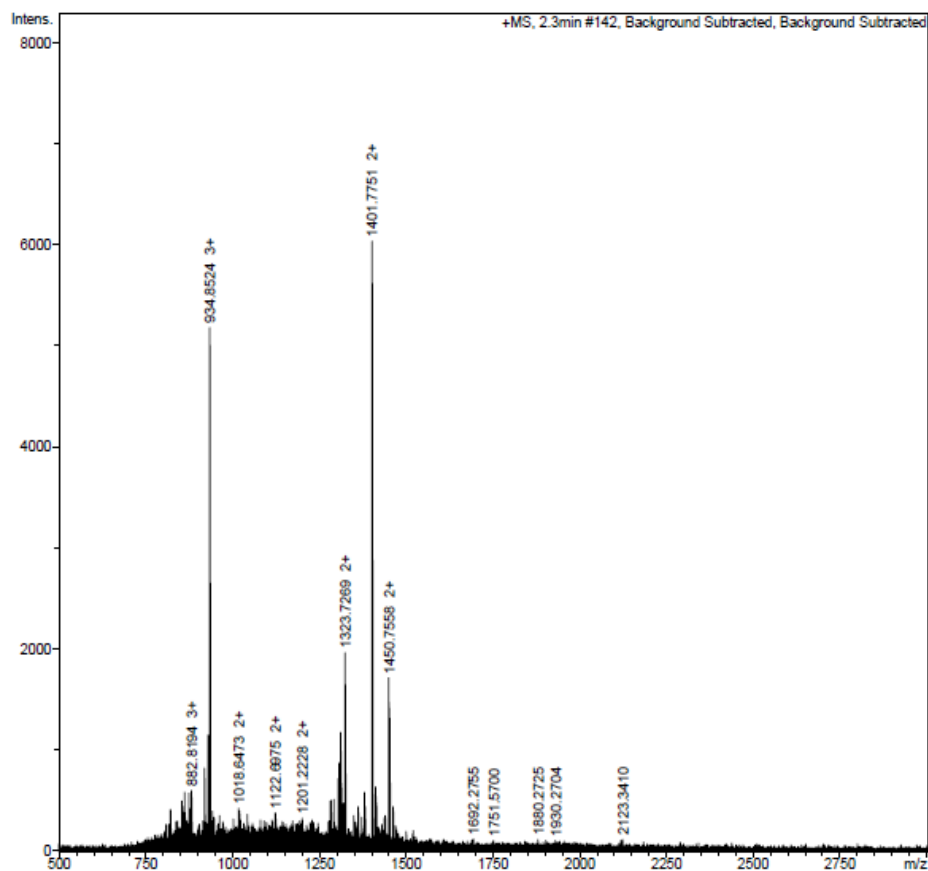
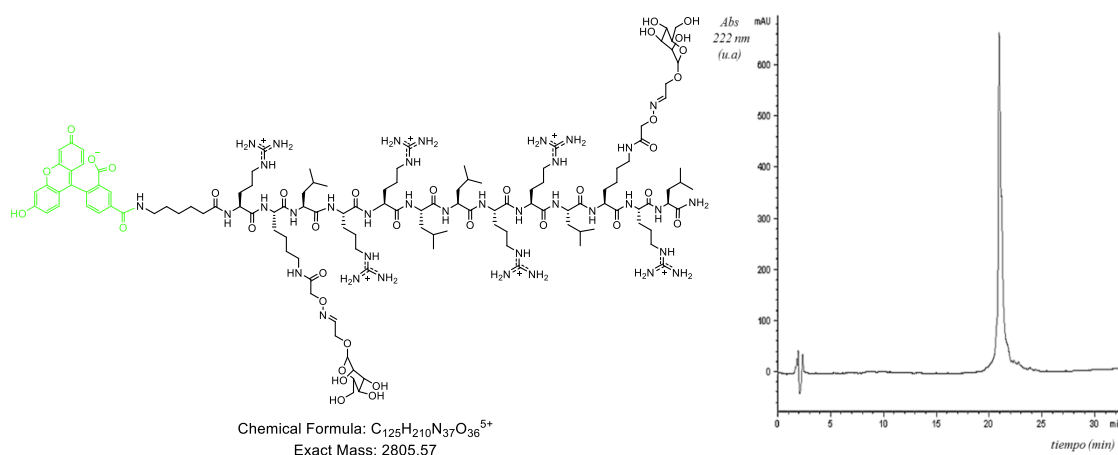


Figura 39. Espectro HPLC, MS y ^1H -RMN del péptido 7

Péptido 8. Se sintetiza siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para péptidos. Se purifica mediante HPLC en fase reversa siguiendo el método: [Nucleosil 120-10-C-18, H_2O con un 0,1% *TFA* (disolvente A) y CH_3CN con 0,1% *TFA* (disolvente B) 95:5 \rightarrow 25:75 (0 \rightarrow 35 min)]. T.r= 21 min; se obtuvieron 49 mg (17%). 1H NMR (D_2O , 500 MHz). δ 8.21 (s, 1H), 7.92 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.58 (dt, 1H), 7.37 (d, 1H), 7.11 (t, J = 10.0 Hz, 2H), 6.97 (dt, J = 27.5 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 6.75 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 4.68 (s, 4H), 4.40 (d, J = 24.1 Hz, 4H), 4.24 – 4.01 (m, 13H), 3.87 – 3.31 (m, 12H), 3.10 – 2.97 (m, 16H), 2.87 (t, J = 10.0 Hz, 2H), 2.25 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.82 – 1.08 (m, 57H), 0.87 – 0.66 (m, J = 21.5, 16.8, 6.9 Hz, 30H). **MS (ESI-FIA-TOF, H_2O):** 1401.7751 (100, $[M + 2H]^+2$); 934.8524 (80, $[M + 3H]^+3$).



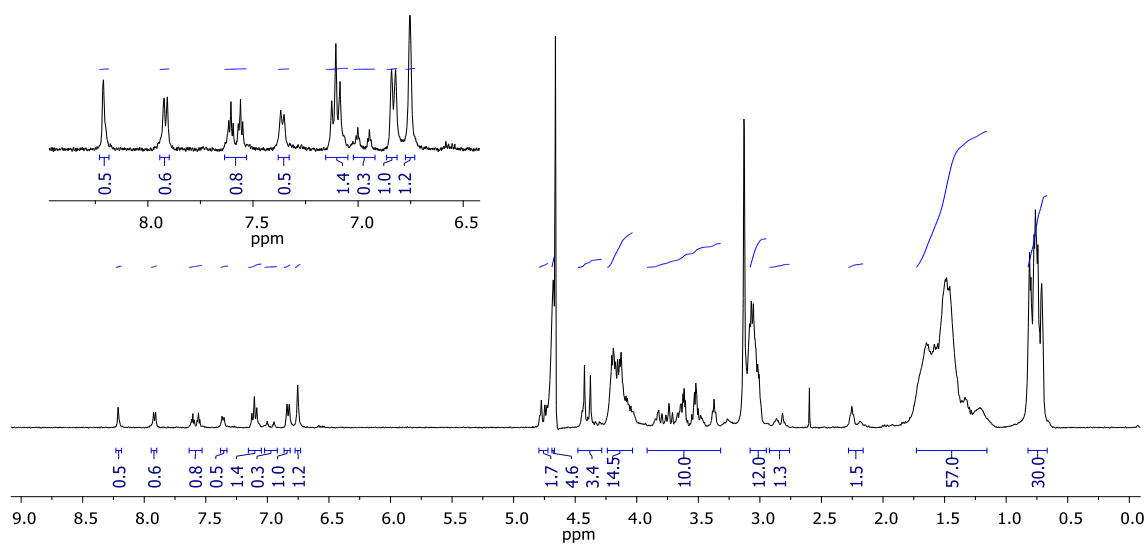


Figura 40. Espectro HPLC, MS y ^1H -RMN del péptido 8

5.4 Protocolo de internalización celular

5.4.1 Internalización del péptido

Una vez sintetizado el péptido con fluoróforo y el derivado de *D*-manosa se disuelve en 1 ml de agua y se mide la absorbancia para averiguar la concentración de la disolución, utilizando la siguiente fórmula.

$$Abs = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Fórmula 2. Fórmula de la ley de Lambert-Beer. Donde $\varepsilon = 81500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para la carboxifluoresceína

Para estos estudios se emplearán células *HeLa* y una concentración $3\mu\text{M}$ del péptido y de la octarginina (en buffer HKR). En primer lugar se lavan las células con buffer HKR (dos veces) para eliminar el medio de cultivo y a continuación se añade cada una de las disoluciones a las células en pocillos diferentes y se incuban durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se aspira el exceso de péptido y se lava otras dos veces con buffer *HKR*. Seguidamente se observan las células en el microscopía de fluorescencia utilizando el objetivo 60x.

5.4.2 Internalización del péptido con la proteína

Igual que en el apartado anterior, se emplearán células *HeLa*, una concentración $3\mu\text{M}$ del péptido 4.3 y 30 nM de Concanavalina A (1: 1000). Para comenzar se preincuba el péptido con la proteína en un eppendorf durante 7 min aproximadamente, durante este tiempo, se lavan las células con buffer *HKR*. A continuación se añade la disolución péptido-proteína a las células y se incuba durante 30 min. A continuación se aspira el exceso y se lava dos veces con buffer *HKR* y se observan mediante microscopía de fluorescencia.

6. Conclusiones

- Se ha comprobado la viabilidad de la estrategia de síntesis en fase sólida para la preparación de péptidos anfifílicos que presenten estructura helicoidal y que contengan residuos nucleófilos para el anclaje de ligandos para proteínas.
- Para simplificar la estrategia de síntesis, se ha utilizado una metodología basada en el empleo de grupos protectores ortogonales. La síntesis en fase sólida permite llevar a cabo diferentes reacciones secundarias sobre la resina.
- Se ha conseguido anclar distintos sacáridos al péptido, puntos de interacción con las lectinas.
- Se ha realizado el acoplamiento de la carboxifluoresceína a la estructura final del péptido con el objetivo de seguir su internalización en células.
- Se ha estudiado la internalización en células del péptido sintetizado y su capacidad para el transporte de proteínas.
- En un futuro trabajo pretendemos estudiar la posibilidad de transportar diferentes proteínas o de seleccionar la internalización en diferentes células mediante el anclaje de diferentes sacáridos, metodología cuya viabilidad hemos demostrado en este proyecto de fin de grado.

6. Conclusións

- Comproboouse a viabilidade da estratexia de síntesis en fase sólida para a preparación de péptidos anfifílicos que presenten estrutura helicoidal y que conteñan residuos nucleófilos para o anclaxe de ligandos para proteínas.
- Para simplificar a estratexia de síntesis, utilizouse unha metodoloxía baseada no emprego de grupos protectores ortogonales. A síntesis en fase sólida permite levar a cabo diferentes reaccións secundarias sobre a resina.
- Conseguíuse anclar distintos sacáridos o péptido, puntos de interacción coas lectinas.
- Realizouse o acoplamento da carboxifluoresceína á estrutura final do péptido co obxectivo de seguir a súa internalización en células.
- Estudouse a internalización en células do péptido sintetizado e a súa capacidade para o transporte de proteínas.
- Nun futuro traballo pretendemos estudar a posibilidade de transportar diferentes proteínas o de seleccionar a internalización en diferentes células mediante o anclaxe de diferentes sacáridos, metodoloxía onde a súa viabilidade demostrouse neste proxecto de fin de grao.

6. Conclusions

- It has been proven the feasibility of the strategy of solid-phase synthesis for the preparation of amphiphilic peptides that adopt a helical structure and that contain nucleophilic residues for the attachment of ligands for proteins.
- In order to simplify our synthetic strategy we have employed a methodology that uses orthogonal protecting groups. Moreover this solid-phase synthesis allows to perform several secondary reactions on the resin.

- The peptide structure has been anchored to different saccharides, which are going to interact with lectins specifically.
- Carboxyfluorescein has been coupled to the final structure of the peptide in order to follow his internalization into cells.
- Internalization of the synthesized peptide has been studied in cells and their ability to transport proteins.
- In future work we intend to study the possibility of transporting different proteins or select the internalization in different cells by anchoring several saccharides.

Anexo I. L-Aminoácidos

Aminoácido	Código		Fórmula	Aminoácido	Código		Fórmula
Ácido Aspártico	Asp	D		Isoleucina	Ile	I	
Ácido Glutámico	Glu	E		Leucina	Leu	L	
Alanina	Ala	A		Lisina	Lys	K	
Arginina	Arg	R		Metionina	Met	M	
Asparagina	Asn	N		Prolina	Pro	P	
Cisteína	Cys	C		Serina	Ser	S	
Glutamina	Gln	Q		Tirosina	Tyr	Y	
Glicina	Gly	G		Treonina	Thr	T	
Fenilalanina	Phe	F		Triptófano	Trp	W	
Histidina	His	H		Valina	Val	V	

Anexo II. Grupos protectores de aminoácidos

PROTECTOR DE α -NH ₂		PROTECTOR DE α -CO ₂ H		PROTECTOR DE AMINOÁCIDOS BÁSICO		
Abrev.	Fórmula	Abrev.	Fórmula		Abrev.	Fórmula
Alloc		2-Cl-Trt		NH ₂ de Lys y Orn	Boc	
Boc		Al			Cl-Z	
Bpoc		Bn			Fmoc	
Ddz		DMB			Z	
Fmoc		Fm			Msc	
Nsc		Me			Mtt	
Pms		pNB			MIS	
Z		^t Bu			Pbf	
Nps		Cam			Pmc	
Trt		TMSE			TOS	
				NH-C(=NH)-NH ₂ de Arg		

